

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



TESIS DOCTORAL

Papel de la lipoatrofia marrón, las isoformas del receptor de insulina y el receptor de IGF-I en la aterosclerosis experimental y humana

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Nuria Beneit Redondo

Directores

**Manuel Benito de las Heras
Almudena Gómez Hernández**

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



TESIS DOCTORAL

Papel de la lipoatrofia marrón, las isoformas del receptor de insulina y el receptor de IGF-I en la aterosclerosis experimental y humana

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

NURIA BENEIT REDONDO

Bajo la dirección de los doctores:

MANUEL BENITO DE LAS HERAS

ALMUDENA GÓMEZ HERNÁNDEZ

Madrid, 2017



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Dr. Manuel Benito de las Heras y la Dra. Almudena Gómez Hernández.

Opta al grado de doctor:

Nuria Beneit Redondo

A mi padre

No temas a las dificultades: lo mejor surge de ellas.

Rita Levi-Montalcini (1909-2012)

Índice

Resumen	1
Abstract.....	9
1. Introducción	17
1.1 Aterosclerosis.....	19
1.1.1 Estructura y función de la pared vascular	19
1.1.2 Disfunción endotelial y formación de la estría grasa	20
1.1.3 Progresión de la lesión aterosclerótica	21
1.1.4 Rotura de la placa y trombosis	22
1.1.5 Moléculas implicadas en la disfunción endotelial, inflamación y progresión de la lesión aterosclerótica.....	25
1.1.5.1 El óxido nítrico	25
1.1.5.2 La endotelina 1	26
1.1.5.3 La angiotensina II	26
1.1.5.4 Moléculas de adhesión celular.....	27
1.1.5.5 Citoquinas y quimioquinas	29
1.1.5.6 Metaloproteinasas de matriz.....	30
1.1.5.7 El inhibidor del activador del plasminógeno 1	31
1.1.6 Modelos animales de aterosclerosis.	32
1.2 Obesidad	35
1.2.1 El órgano adiposo	35
1.2.1.1 El tejido adiposo blanco	35
1.2.1.2 El tejido adiposo marrón	37
1.2.1.3 El tejido adiposo perivascular	39
1.2.2 Complicaciones vasculares asociadas a la obesidad.....	40
1.2.3 Papel potencial del tejido adiposo marrón en el tratamiento de la obesidad	41
1.3 Resistencia a la insulina y diabetes tipo 2	43
1.3.1 La diabetes y sus complicaciones en la actualidad	43
1.3.2 Fisiopatología de la diabetes tipo 2 y la resistencia a la insulina	43
1.3.3 Modelos animales de resistencia a la insulina	45
1.3.3.1 Modelos animales carentes del receptor de insulina de forma específica de tejido	46
1.3.3.2 El modelo BATIRKO	48
1.3.4 Complicaciones vasculares asociadas a la diabetes tipo 2	49
1.4 Señalización celular.....	50
1.4.1 La insulina y los factores de crecimiento similares a la insulina.....	50
1.4.2 El receptor de insulina y sus isoformas	51
1.4.3 Transducción de la señal	52
1.4.3.1 Ruta PI3K/Akt	53
1.4.3.2 Ruta Ras-MAPK.....	54
1.4.4 El receptor de IGF-I y los receptores híbridos IR/IGF-IR	54
1.4.5 El receptor de IGF-II.....	56
1.4.6 Papel de las isoformas del receptor de insulina en la enfermedad	57
2. Objetivos	59
3. Materiales y métodos	63
3.1 Muestras humanas	65
3.1.1 Segmentos aórticos humanos.....	65
3.1.2 Placas de pacientes con aterosclerosis carotídea.....	65
3.1.3 Tinción tricrómica de Masson de placas ateroscleróticas humanas	66
3.1.4 Inmunohistoquímica en placas ateroscleróticas humanas	66
3.2 Experimentación animal.....	68
3.2.1 Trabajo con modelos animales	68
3.2.2 Generación de los modelos animales	68
3.2.2.1 Generación del modelo BATIRKO	68

3.2.2.2	Generación del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	68	3.3.3.1	Ensayo de migración celular por cierre de herida.....	79
3.2.2.3	Modelo ApoE ^{-/-}	69	3.3.3.2	Análisis de la actividad gelatinasa por zimografía.....	79
3.2.3	Caracterización genética de los modelos animales	69	3.4	Análisis de la expresión génica.....	80
3.2.4	Diseño de los modelos experimentales	70	3.4.1	Aislamiento de RNA	80
3.2.4.1	Modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-} de 24 semanas de edad sometido a dieta tipo <i>Western</i>	70	3.4.2	Valoración de ácidos nucleicos	80
3.2.4.2	Modelo ApoE ^{-/-} de diferentes semanas de edad sometido a dieta tipo <i>Western</i>	70	3.4.3	Síntesis de DNA complementario por PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR).....	80
3.2.4.3	Modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-} de 15 meses de edad	70	3.4.4	PCR y electroforesis en geles de agarosa.....	81
3.2.5	Técnicas empleadas en los modelos experimentales	71	3.4.5	PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	81
3.2.5.1	Test de tolerancia a la glucosa.....	71	3.5	Análisis de la expresión de proteínas	83
3.2.5.2	Test de tolerancia a la insulina	72	3.5.1	Extracción de proteínas.....	83
3.2.5.3	Test de secreción de insulina	72	3.5.1.1	Obtención de extractos proteicos	83
3.2.5.4	Señalización <i>in vivo</i> de insulina	72	3.5.1.2	Valoración de proteínas.....	83
3.2.5.5	Determinación del perfil metabólico y lipídico	72	3.5.2	<i>Western blot</i>	83
3.2.5.6	Resonancia magnética nuclear	73	3.5.2.1	Preparación de las muestras para la electroforesis	83
3.2.5.7	Tinción de hematoxilina y eosina	73	3.5.2.2	Electroforesis en geles de SDS-PAGE	84
3.2.5.8	Tinción de Oil Red O	74	3.5.2.3	Transferencia a membranas de PVDF	84
3.2.5.9	Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	74	3.5.2.4	Bloqueo e incubación con anticuerpos	84
3.3	Cultivos celulares	76	3.5.2.5	Detección de anticuerpos por quimioluminiscencia.....	85
3.3.1	Generación de líneas celulares de músculo liso vascular	76	3.5.2.6	Borrado de membranas de PVDF.....	85
3.3.1.1	Obtención de cultivo primario de células de músculo liso vascular de aorta de ratón	76	3.5.3	Inmunoprecipitación	85
3.3.1.2	Generación de líneas celulares estables	76	3.6	Otras técnicas	86
3.3.1.3	Deleción <i>in vitro</i> del IR por expresión de la recombinasa Cre	77	3.6.1	Cuantificación	86
3.3.1.4	Generación de líneas celulares mediante infección retroviral	77	3.6.1.1	<i>Blots</i>	86
3.3.2	Condiciones de cultivo, mantenimiento y experimentación	78	3.6.1.2	Imágenes de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	86
3.3.2.1	Condiciones de cultivo.....	78	3.6.1.3	Imágenes de resonancia magnética nuclear	86
3.3.2.2	Congelación, criopreservación y descongelación de las líneas celulares	78	3.6.1.4	Ensayo de cierre de herida.....	86
3.3.2.3	Condiciones de experimentación	79	3.6.2	Análisis estadístico	87
3.3.3	Técnicas empleadas en los cultivos celulares	79	3.7	Materiales.....	88
			3.7.1	Reactivos.....	88
			3.7.2	Estímulos e inhibidores empleados en la experimentación con cultivos celulares	88
			3.7.3	Listado de anticuerpos	89

4. Resultados.....91

4.1 La lipoatrofia marrón severa agrava el proceso aterosclerótico experimental 93

4.1.1 La lipoatrofia marrón severa induce adiposidad y alteraciones del metabolismo lipídico y de la glucosa 94

4.1.2 La lipoatrofia marrón severa agrava el proceso aterosclerótico 101

4.1.3 La lipoatrofia marrón severa induce resistencia periférica a la insulina ... 104

4.1.4 Contribución del BAT, WAT visceral y PVAT torácico a la inflamación observada en el modelo BATIRKO; ApoE^{-/-} 104

4.2 El papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos en las fases iniciales del proceso aterosclerótico 106

4.2.1 Señalización de insulina e IGFs en las células de músculo liso vascular..... 106

4.2.2 Contribución diferencial de las isoformas del IR y del IGF-IR a la migración de las células de músculo liso vascular 108

4.2.3 La inhibición del IGF-IR reduce notablemente la migración de las células de músculo liso vascular..... 111

4.2.4 La insulina y el IGF-II estimulan la formación de receptores híbridos IRA/IGF-IR en las células de músculo liso vascular 113

4.2.5 El papel de las isoformas el IR y del IGF-IR en la migración de las VSMCs en un modelo experimental de aterosclerosis 114

4.2.6 Expresión del mRNA de las isoformas del IR, el IGF-IR y los IGFs en la capa media de aortas humanas..... 118

4.3 El papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y el IGF-IIIR en las fases avanzadas del proceso aterosclerótico 120

4.3.1 Expresión de las isoformas del IR y los receptores de IGFs en placas complicadas y no complicadas de pacientes con aterosclerosis carotídea 120

4.3.2 Las placas complicadas de pacientes con aterosclerosis carotídea presentan un menor número de células de músculo liso vascular 124

4.3.3 Expresión de las isoformas del IR y los receptores de IGFs en modelos experimentales de aterosclerosis.... 124

4.3.4 Las lesiones ateroscleróticas avanzadas de modelos experimentales presentan menor contenido de células de músculo liso vascular y mayor apoptosis 128

4.3.5 El IGF-IR tiene un papel antiapoptótico en las células de músculo liso vascular 130

5. Discusión 133

5.1 La lipoatrofia marrón severa agrava el proceso aterosclerótico experimental 135

5.2 El papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos en las fases iniciales del proceso aterosclerótico138

5.3 El papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y el IGF-IIIR en las fases avanzadas del proceso aterosclerótico 142

6. Conclusiones 147

7. Bibliografía..... 151

8. Anexos 171

Índice de tablas

Tabla 1.1 Modelos animales de aterosclerosis	33
---	----

Tabla 1.2 Modelos animales <i>knock-out</i> para el receptor de insulina específicos de tejido	47
---	----

Tabla 3.1 <i>Primers</i> usados para el genotipado	69
---	----

Tabla 3.2 Sondas TaqMan usadas en qRT-PCR	82
--	----

Tabla 3.3 <i>Primers</i> usados en qRT-PCR	82
---	----

Tabla 3.4 Anticuerpos primarios utilizados ..	89
--	----

Tabla 3.5 Anticuerpos secundarios utilizados	90
---	----

Tabla 4.1 Perfil metabólico y lipídico del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-} WD	94
--	----

Tabla 4.2 Perfil metabólico y lipídico del modelo ApoE ^{-/-} WD de 8, 12, 18 y 24 semanas de edad	115
---	-----

Índice de figuras

Figura 1.1 Estructura de la pared arterial...	Figura 1.15 Esquema de la señalización de la insulina.....
..... 19	53
Figura 1.2 Mecanismos implicados en el desarrollo de la estría grasa.....	Figura 1.16 Estructura y sitios de autofosforilación del IR y el IGF-IR.....
21	55
Figura 1.3 Progresión de la lesión aterosclerótica	Figura 1.17 Familia de receptores de la insulina e IGFs.....
22	56
Figura 1.4 Rotura de placa y trombosis	Figura 1.18 Esquema de la estructura del IGF-IIR
23	56
Figura 1.5 Esquema de la evolución de una placa aterosclerótica	Figura 3.1 Esquema y clasificación histológica de las lesiones ateroscleróticas humanas según su evolución y progresión
24	65
Figura 1.6 Esquema de la cascada de adhesión leucocitaria.....	Figura 3.2 Diseño experimental del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-} de 24 semanas de edad sometido a dieta tipo <i>Western</i>
28	70
Figura 1.7 Esquema del papel de PAI-1 en el sistema fibrinolítico.....	Figura 3.3 Diseño experimental del modelo ApoE ^{-/-} de diferentes semanas de edad sometido a dieta tipo <i>Western</i>
31	71
Figura 1.8 Procesos fisiológicos regulados por las adipoquinas secretadas por el WAT	Figura 3.4 Diseño experimental del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-} de 15 de edad.....
36	71
Figura 1.9 Los colores del tejido adiposo ...	Figura 3.5 Esquema de la eliminación del exón 4 del gen del receptor de insulina por el sistema Cre/LoxP
38	77
Figura 1.10 Esquema de los diferentes órganos implicados en el desarrollo de diabetes tipo 2	Figura 3.6 Picrodopofilina (PPP)
44	89
Figura 1.11 Progresión de la diabetes tipo 2	Figura 4.1 Expresión del IR en distintos tejidos del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}
45	93
Figura 1.12 Esquema de los factores implicados en el desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes ..	Figura 4.2 Contenido y estudio histológico del BAT del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}
49	95
Figura 1.13 La insulina y los IGFs	Figura 4.3 Expresión de UCP-1 en el BAT del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}
50	96
Figura 1.14 El receptor de insulina y sus isoformas	
51	

Figura 4.4 Expresión de marcadores termogénicos en el BAT del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	96
Figura 4.5 Expresión de marcadores de contenido mitocondrial en el BAT del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	97
Figura 4.6 Expresión de proteínas implicadas en el metabolismo lipídico en el BAT del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	98
Figura 4.7 Contenido de grasa corporal total en el modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	99
Figura 4.8 Perfil lipídico del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	99
Figura 4.9 Niveles de glucemia e insulinemia en el modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	100
Figura 4.10 Estudio de las alteraciones metabólicas en el modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	100
Figura 4.11 Estudio histológico y contenido lipídico en el hígado del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	101
Figura 4.12 Señalización <i>in vivo</i> de insulina y niveles de TNF-α en el hígado del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	102
Figura 4.13 Estudio del daño vascular del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	103
Figura 4.14 Expresión de genes de daño vascular en la arteria aorta del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	103
Figura 4.15 Expresión de iNOS en el arco aórtico del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	104
Figura 4.16 Señalización <i>in vivo</i> de insulina en el modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	105
Figura 4.17 Expresión de citoadipoquinas en el órgano adiposo del modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	105
Figura 4.18 Expresión del IR y del IGF-IR en las VSMCs	106
Figura 4.19 Señalización de insulina e IGFs en las VSMCs	107

Figura 4.20 Activación del IR y del IGF-IR en respuesta a insulina o IGFs en las VSMCs	108
Figura 4.21 Migración basal de las VSMCs	109
Figura 4.22 Efecto de la insulina en la migración de las VSMCs	109
Figura 4.23 Efecto del IGF-I en la migración de las VSMCs	110
Figura 4.24 Efecto del IGF-II en la migración de las VSMCs	110
Figura 4.25 Análisis de la actividad de las MMP-2 y MMP-9 mediante zimografía de gelatina en las IRA e IRB VSMCs	111
Figura 4.26 Efecto de la picropodofilina (PPP) en la activación del IGF-IR en las VSMCs	112
Figura 4.27 Efecto de la inhibición del IGF-IR en la migración basal de las VSMCs	112
Figura 4.28 Efecto de la inhibición del IGF-IR en la migración inducida por la insulina o los IGFs	113
Figura 4.29 Formación de receptores híbridos IRA/IGF-IR o IRB/IGF-IR en las VSMCs	114
Figura 4.30 Expresión del mRNA de las isoformas del IR y del IGF-IR en la aorta del modelo ApoE ^{-/-}	115
Figura 3.31 Caracterización de las lesiones ateroscleróticas en el modelo ApoE ^{-/-}	116
Figura 4.32 Expresión proteica del IR y del IGF-IR en el arco aórtico del modelo ApoE ^{-/-}	117
Figura 4.33 Migración y expresión del IR y el IGF-IR por las VSMCs en la íntima de placas ateroscleróticas del modelo ApoE ^{-/-}	118
Figura 4.34 Expresión del mRNA de las isoformas del IR, el IGF-IR y los IGFs en la capa media de aortas humanas	119

Figura 4.35 Estudio histológico de placas ateroscleróticas humanas	121
Figura 4.36 Expresión del IR, IGF-IR, IGF-IIR, IGF-I e IGF-II en placas ateroscleróticas humanas	121
Figura 4.37 Expresión de las isoformas del IR y su asociación con el IGF-IR y con el IRS-1 en placas ateroscleróticas humanas complicadas y no complicadas.....	122
Figura 4.38 Expresión del IGF-IR y del IGF-IIR en placas ateroscleróticas humanas complicadas y no complicadas.....	123
Figura 4.39 Expresión de la α -SMA en placas ateroscleróticas humanas complicadas y no complicadas.....	124
Figura 4.40 Expresión del IR en la aorta del modelo experimental de 24 semanas	125
Figura 4.41 Expresión del IGF-IR en la aorta del modelo experimental de 24 semanas .	126
Figura 4.42 Expresión del IGF-IIR en el arco aórtico del modelo experimental de 24 semanas	126
Figura 4.43 Expresión del IR en el arco aórtico del modelo experimental de 15 meses	127
Figura 4.44 Expresión del IGF-IR en el arco aórtico del modelo experimental de 15 meses	127
Figura 4.45 Contenido de VSMCs en el arco aórtico del modelo experimental de 24 semanas	128
Figura 4.46 Contenido de VSMCs en el arco aórtico del modelo experimental de 15 meses	129
Figura 4.47 Presencia de apoptosis en el arco aórtico del modelo experimental de 24 semanas	129
Figura 4.48 Presencia de apoptosis en el arco aórtico del modelo experimental de 15 meses	130
Figura 4.49 Efecto de la inhibición del IGF-IR en la apoptosis de las VSMCs.....	131
Figura 4.50 Efecto de la tapsigargina en la apoptosis de las VSMCs.....	131
Figura 4.51 Efecto protector del IGF-I frente a la apoptosis inducida por tapsigargina en las VSMCs.....	132
Figura 5.1 Esquema que muestra las alteraciones metabólicas y vasculares en el modelo BATIRKO; ApoE ^{-/-}	137
Figura 5.2 Representación esquemática del papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos en la migración de las VSMCs.....	141
Figura 5.3. Representación esquemática de una placa aterosclerótica avanzada	146

Abreviaturas

α-SMA	α -Actina de músculo liso	ICAM	Molécula de adhesión intercelular
ACE	Enzima convertidora de angiotensina	IFN-γ	Interferón γ
Akt	<i>AK strain transforming; v-akt murine thymoma viral homolog 1</i>	IGFBP	Proteína de unión a IGF
AMPK	Proteína quinasa activada por adenosín monofosfato	IGF-I	Factor de crecimiento similar a la insulina I
Ang II	Angiotensina II	IGF-II	Factor de crecimiento similar a la insulina II
ApoE	Apolipoproteína E	IGF-IIR	Receptor de IGF-II
BAT	Tejido adiposo marrón	IGF-IR	Receptor de IGF-I
BATIRKO	Ratón <i>knock-out</i> para el receptor de insulina en el BAT	IL	Interleuquina
CAMs	Moléculas de adhesión celular	IR	Receptor de insulina
CD36	Clúster de diferenciación 36	IRA	Isoforma A del receptor de insulina
CPTI-M	Carnitina palmitoiltransferasa I	IRB	Isoforma B del receptor de insulina
DMEM	Medio de Eagles modificado por Dulbecco	IRS	Sustrato del receptor de insulina
DNA	Ácido desoxirribonucleico	ITT	Test de tolerancia a la insulina
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares	LDL	Lipoproteína de baja densidad
ET-1	Endotelina 1	LDLR	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
FBS	Suero fetal bovino	MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
FGF21	Factor de crecimiento de fibroblastos 21	MCP-1	Proteína quimiotáctica para monocitos 1
FoxO	<i>Forkhead box</i> clase O	MEK	<i>Mitogen extracelular-signal regulated kinase</i>
GTT	Test de tolerancia a la glucosa	MMPs	Metaloproteinasas de matriz
HDL	Lipoproteína de alta densidad	mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
HSL	Lipasa sensible a hormonas	NO	Óxido nítrico
Hsp60	Proteína de shock térmico 60	NOS	Óxido nítrico sintasa

p70S6K	Proteína quinasa ribosomal S6 de 70 kDa	RMN	Resonancia magnética nuclear
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1	RNA	Ácido ribonucleico
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa	ROS	Especies reactivas de oxígeno
PBS	Tampón fosfato salino	rpm	Revoluciones por minuto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	SR-A	Receptor <i>scavenger</i> A
PECAM-1	Molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas 1	TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
PGC-1α	Coactivador 1α del receptor activado por proliferadores de peroxisomas y	TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa	UCP-1	Proteína desacoplante 1
PPAR	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas	VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares 1
PRDM16	Proteína con dominio PR 16	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
PVAT	Tejido adiposo perivascular	VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
qRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real	VSMCs	Células de músculo liso vascular
		WAT	Tejido adiposo blanco
		WT	<i>Wild type</i> (tipo silvestre)

Resumen

Papel de la lipoatrofia marrón, las isoformas del receptor de insulina y el receptor de IGF-I en la aterosclerosis experimental y humana

Introducción

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y ocurre cuando la ingesta excede al gasto energético (Mathieu *et al.*, 2010). Se caracteriza por la acumulación excesiva o anormal de tejido adiposo, incluyendo el tejido adiposo perivascular (PVAT), capaz de secretar numerosas sustancias biológicamente activas y que ha sido implicado en la inflamación vascular (Brown *et al.*, 2014; Omar *et al.*, 2014).

Actualmente, está bien establecida la capacidad del tejido adiposo marrón (BAT) de proteger frente a la obesidad. Además, los individuos con menor cantidad de BAT son más propensos a la acumulación excesiva de tejido adiposo blanco (WAT), existiendo una relación inversa entre los niveles de BAT y el índice de masa corporal (Cypess *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2009). Es por ello que el estudio de este tejido ha adquirido un gran interés como una posible diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad y sus complicaciones metabólicas y vasculares asociadas. En este contexto, trabajos previos de nuestro grupo pusieron de manifiesto que la ausencia del receptor de insulina (IR) específica del BAT (modelo BATIRKO) conduce a una pérdida de la masa de este tejido (Guerra *et al.*, 2001), y que esta lipoatrofia marrón confiere una mayor susceptibilidad a la obesidad, junto con la presencia de alteraciones vasculares como disfunción vascular y resistencia vascular a la insulina (Gómez-Hernández *et al.*, 2012).

Por otro lado, es conocido que la aterosclerosis es la principal causa de las enfermedades cardiovasculares. La progresión de las lesiones vasculares iniciales hasta la formación de placas avanzadas es un proceso complejo en el que las células de músculo liso vascular (VSMCs) juegan un papel relevante (Bennett *et al.*, 2016). En las etapas tempranas, como resultado de la lesión vascular, se producen cambios en el entorno de las VSMCs, entre los que se incluyen el aumento de la disponibilidad de factores de crecimiento y alteraciones celulares, que conducen a la proliferación y migración de las VSMCs y, con ello, a la formación de una placa aterosclerótica organizada (Johnson, 2014). En estadios más avanzados, en los que existe un alto riesgo de que se desencadenen eventos cardiovasculares agudos, uno de los principales mecanismos que contribuye a la inestabilidad de la placa aterosclerótica es la pérdida de VSMCs como consecuencia de un aumento de su apoptosis (Littlewood y Bennett, 2003).

Un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la aterosclerosis es crucial para identificar nuevas estrategias terapéuticas que frenen la progresión de la enfermedad, previniendo así la aparición de consecuencias clínicas. En este sentido, previamente habíamos demostrado que la isoforma A del IR (IRA), y su asociación con el receptor de IGF-I (IGF-IR), confiere una ventaja proliferativa a las VSMCs en respuesta a distintos estímulos proaterogénicos (Gómez-Hernández *et al.*, 2013). Sin embargo, el papel de las isoformas del IR y del IGF-IR en la migración o en la apoptosis de las VSMCs continuaba siendo desconocido.

Objetivos

Los principales objetivos planteados en esta tesis fueron los siguientes:

1. Investigar si la lipoatrofia marrón severa agrava el proceso aterosclerótico experimental.
2. Estudiar el papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos IR/IGF-IR en las fases iniciales del proceso aterosclerótico.
3. Estudiar el papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y el IGF-IIR en las fases avanzadas del proceso aterosclerótico.

Métodos y resultados

1. La lipoatrofia marrón severa agrava el proceso aterosclerótico experimental

Para el desarrollo del primer objetivo generamos un nuevo modelo de ratón carente del IR específicamente en el BAT y sin apolipoproteína E (modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}) y se estudiaron cinco grupos de ratones (Control STD, Control WD, BATIRKO WD, ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD). Los animales fueron alimentados con una dieta estándar (STD) o tipo *Western* (WD) durante 18 semanas y se sacrificaron a las 24 semanas edad. Para caracterizar el nuevo modelo estudiamos la funcionalidad del BAT y los principales parámetros metabólicos y lipídicos. Tanto el ratón BATIRKO como el BATIRKO; ApoE^{-/-} desarrollan lipoatrofia marrón severa caracterizada por la disminución de la masa de BAT interescapular, una marcada eosinofilia en el BAT y una reducción del tamaño de los adipocitos marrones. Como un posible mecanismo compensatorio para mantener la integridad funcional del tejido, los niveles de UCP-1 y otros marcadores termogénicos (PRDM16, FGF21 y PGC-1 α) estaban aumentados en el BAT de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD.

Comprobamos que la lipoatrofia marrón confería susceptibilidad a la obesidad en los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD, pues presentaban un incremento de la adiposidad visceral y, principalmente, del compartimento gonadal. Asimismo, mediante imágenes de resonancia magnética nuclear observamos que el volumen de grasa corporal total era significativamente mayor en los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD. Los niveles de colesterol y triglicéridos estaban aumentados en los grupos ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD, siendo, además, estos últimos significativamente mayores en los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD respecto a los ApoE^{-/-} WD. La lipoatrofia marrón severa en el ratón BATIRKO; ApoE^{-/-} también lleva asociadas alteraciones del metabolismo de la glucosa, tales como una glucemia postprandial elevada, una marcada hipoinsulinemia, una notable intolerancia a la glucosa y cierto grado de intolerancia a la insulina, junto con un defecto en la secreción aguda de insulina.

Analizamos mediante tinción de Oil Red O el contenido lipídico en el hígado y encontramos una marcada esteatosis hepática en los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD. Además, mediante estudios de señalización *in vivo* de insulina observamos una importante resistencia a la insulina, pues la fosforilación de Akt en respuesta a la hormona se perdía por completo en el hígado de

los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD. Estos resultados se correlacionan con el aumento de los niveles hepáticos de TNF- α observado en los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD.

Con la finalidad de investigar si la lipoatrofia marrón podría causar un agravamiento del proceso aterogénico, estudiamos el daño vascular en el modelo BATIRKO; ApoE^{-/-} comparativamente con el modelo ApoE^{-/-}. Así, el grado de estenosis, el área de lesión y el contenido lipídico estaban significativamente incrementados en el arco aórtico de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD. Mediante inmunohistoquímica también observamos un mayor infiltrado de macrófagos y un aumento de la expresión de la iNOS en el arco aórtico del nuevo modelo. Asimismo, mediante qRT-PCR encontramos que la expresión de diferentes genes implicados en el proceso aterogénico, tales como ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- α , PAI-1 e IGF-IR, estaba significativamente aumentada en la aorta de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD. Sin embargo, los niveles de la eNOS estaban notablemente disminuidos en la aorta del nuevo modelo, agravando la pérdida de vasodilatación dependiente de NO.

Además de la resistencia primaria a la insulina en el BAT, consecuencia de la ausencia del IR en este tejido, encontramos una resistencia secundaria a la insulina en la aorta, corazón, WAT gonadal (gWAT) y PVAT torácico (tPVAT) de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD.

Finalmente, nos planteamos si el aumento de la adiposidad visceral en el ratón BATIRKO; ApoE^{-/-} podría influir en la expresión de adipoquinas proinflamatorias responsables de las alteraciones metabólicas y vasculares asociadas a dicha adiposidad. Para ello, analizamos mediante qRT-PCR los niveles del mRNA del TNF- α , la leptina y la adiponectina en el BAT y en distintos compartimentos del WAT. Así, el TNF- α estaba significativamente aumentado en el BAT, gWAT y tPVAT y la leptina también lo estaba en los dos últimos tejidos, mientras que la adiponectina se encontraba disminuida significativamente en el WAT visceral (gWAT y rpWAT) y en el tPVAT de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD.

2. El papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos en las fases iniciales del proceso aterosclerótico

Para abordar el segundo objetivo estudiamos el efecto de la insulina y los IGFs en la migración de las VSMCs, así como la contribución de las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos IR/IGF-IR a este proceso. Así, llevamos a cabo ensayos de cierre de herida en cuatro líneas de VSMCs de aorta de ratón: IRLoxP^{+/+} VSMCs (con IR), IR^{-/-} VSMCs (sin IR), IRA VSMCs (expresan la isoforma IRA) e IRB VSMCs (expresan la isoforma IRB). El IGF-I indujo fuertemente la migración de todas las líneas celulares, incluidas las IR^{-/-} VSMCs, lo que sugiere que su efecto está mediado principalmente a través del IGF-IR. Por el contrario, la insulina y el IGF-II parecen requerir la presencia del IR y, concretamente, de la isoforma IRA, pues solo estimularon la migración en las IRA VSMCs a las 12 y 24 horas de realizar la herida. El tratamiento con picropodofilina (PPP), un inhibidor altamente específico de la fosforilación en tirosina del IGF-IR, causó una notable y significativa reducción de la migración de las VSMCs en condiciones basales. Además, observamos que la inhibición del IGF-IR suprimió por completo la migración inducida por la insulina y el IGF-II en las IRB VSMCs, mientras que solo inhibió parcialmente la migración de las IRA VSMCs. Sin embargo,

la migración estimulada por el IGF-I fue inhibida por PPP a un nivel similar en las dos líneas IRA e IRB VSMCs.

Todas las líneas celulares mostraron una asociación basal entre el IR y el IGF-IR. Sin embargo, la expresión de los receptores híbridos IRA/IGF-IR aumentaba significativamente solo en las IRA VSMCs tras la estimulación con insulina o IGF-II, pero no con IGF-I, durante 12 horas. Estos resultados son consistentes con la mayor migración observada en las IRA VSMCs estimuladas con insulina o IGF-II.

Nos planteamos si algunos de los mecanismos estudiados *in vitro* podrían ser relevantes *in vivo*. Con esta finalidad analizamos mediante qRT-PCR la expresión del mRNA de las isoformas IRA e IRB y del IGF-IR en la aorta del modelo ApoE^{-/-} de 8, 12, 18 y 24 semanas de edad. Encontramos un incremento significativo de la expresión de la isoforma IRA y del IGF-IR en los ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas. Por el contrario, la isoforma IRB estaba disminuida en la aorta de todos los grupos de ratones ApoE^{-/-}. Los niveles proteicos del IR total, analizados por inmunohistoquímica, en el arco aórtico de los ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas eran similares a los de sus controles. Además del incremento en la expresión génica del IGF-IR, observamos un incremento significativo de sus niveles proteicos en el arco aórtico de los ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas. Para localizar las VSMCs en los arcos aórticos estudiamos por inmunofluorescencia la expresión de la α -SMA, un conocido marcador de células de músculo liso. Así, observamos la presencia de VSMCs en la íntima de placas fibrosas de los ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas. Comprobamos, además, mediante una doble inmunofluorescencia que estas VSMCs presentes en las placas fibrosas expresaban el IR o el IGF-IR.

Por último, analizamos la expresión del mRNA del IR total, específicamente de las isoformas IRA e IRB, del IGF-IR y de los IGFs en la capa media de segmentos aórticos humanos con y sin lesiones ateroscleróticas iniciales. Encontramos un marcado y significativo incremento de la isoforma IRA en la capa media de las aortas con lesiones de tipo estría grasa o lesiones fibrolipídicas. Asimismo, la expresión del mRNA del IGF-IR, el IGF-I y el IGF-II también estaba notablemente aumentada en las aortas con estrías grasas.

3. El papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y el IGF-IIR en las fases avanzadas del proceso aterosclerótico

Para estudiar el papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y el IGF-IIR en la aterosclerosis avanzada empleamos placas ateroscleróticas de pacientes sometidos a una endarterectomía carotídea, modelos animales de aterosclerosis (ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-}) y líneas de VSMCs (IRLoxP^{+/+} e IR^{-/-} VSMCs).

En primer lugar, analizamos mediante inmunohistoquímica la expresión del IR, el IGF-IR, el IGF-IIR y los IGFs en distintas zonas (capa media, región fibrosa y región de los hombros) de placas ateroscleróticas humanas, encontrando un incremento significativo de todos ellos en la región de los hombros. Para evaluar la expresión de las isoformas del IR de forma comparativa en placas complicadas y no complicadas de aterosclerosis carotídea empleamos inmunoprecipitaciones consecutivas, primero, de la isoforma IRB y, seguidamente, de la IRA. De esta forma, observamos una disminución significativa de la isoforma IRA, junto con un

aumento de la IRB, en las placas complicadas respecto a las no complicadas. Asimismo analizamos los niveles proteicos del IGF-IR y del IGF-IIR en los sobrenadantes de la segunda inmunoprecipitación, encontrando una reducida expresión del IGF-IR, mientras que el IGF-IIR estaba incrementado en las placas complicadas. Además, la expresión de la α -SMA resultó ser significativamente menor en las placas ateroscleróticas complicadas, indicando una menor cantidad de VSMCs en las mismas.

En los modelos animales, estudiamos la expresión del IR, el IGF-IR y la α -SMA, así como la presencia de células apoptóticas, en el arco aórtico de ratones Control, ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-} de 24 semanas alimentados con dieta tipo *Western* o de ratones Control, ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-} de 15 meses con dieta estándar. Se evaluaron, además, los niveles del mRNA de las isoformas del IR y del IGF-IR en la aorta de los grupos de animales de 24 semanas. Los niveles proteicos del IR en el arco aórtico eran muy similares entre los distintos grupos de animales de los dos modelos experimentales. Sin embargo, la expresión génica de la isoforma IRA estaba significativamente disminuida, mientras que la IRB estaba aumentada, en la aorta de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas, lo que se correlaciona con la reducción del ratio IRA/IRB observada en placas complicadas de aterosclerosis carotídea. En el caso del IGF-IR, sus niveles proteicos y de mRNA estaban incrementados en los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas. De forma coherente con la reducción de las VSMCs observada en placas complicadas de aterosclerosis carotídea, la expresión de la α -SMA era significativamente menor en el arco aórtico de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas y de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} de 15 meses, en comparación con sus respectivos controles. Asimismo, estos datos se correlacionan con un marcado aumento del número de células apoptóticas en el arco aórtico de estos dos grupos de animales.

Mediante *Western blot* frente a la caspasa 3 activa observamos que la inhibición del IGF-IR por PPP inducía la apoptosis de las dos líneas de VSMCs estudiadas. Además, la activación de la caspasa 3 por la tapsigargina, un inhibidor de la Ca²⁺/ATPasa que induce estrés en el retículo endoplásmico, fue menor en las IR^{-/-} VSMCs, probablemente por la mayor expresión del IGF-IR en relación a las IRLoxP^{+/+} VSMCs. Finalmente, el pretratamiento con IGF-I, pero no con IGF-II, reducía la apoptosis inducida por la tapsigargina en las dos líneas de VSMCs.

Conclusiones

Las conclusiones derivadas de la presente tesis son las siguientes:

1. La lipoatrofia marrón severa confiere susceptibilidad a la obesidad y conduce a alteraciones metabólicas y vasculares que agravan el proceso aterosclerótico.
2. La isoforma IRA y el IGF-IR tienen un papel diferencial en la aterosclerosis temprana y avanzada. En las etapas iniciales la sobreexpresión de dichos receptores puede favorecer la migración y proliferación de las células de músculo liso vascular, contribuyendo a la progresión de la enfermedad. Por el contrario, en estadios más avanzados previenen la inestabilidad de las placas ateroscleróticas reduciendo el riesgo de rotura y la aparición de consecuencias clínicas.

Abstract

Role of brown fat lipoatrophy, insulin receptor isoforms and IGF-I receptor in human and experimental atherosclerosis

Introduction

Obesity occurs when energy intake exceeds energy expenditure and it is a major risk factor for the development of associated metabolic diseases and cardiovascular damage (Mathieu et al., 2010). It is characterized by excessive or abnormal accumulation of adipose tissue, including perivascular adipose tissue (PVAT) that secretes numerous biologically active substances and it is involved in vascular inflammation (Brown et al., 2014; Omar et al., 2014).

Currently, it is well-established that brown adipose tissue (BAT) is able to protect against obesity. In addition, individuals with low BAT levels are prone to excessive accumulation of white adipose tissue (WAT), BAT levels being inversely correlated with body mass index (Cypess et al., 2009; Saito et al., 2009). For this reason, the study of BAT has been of great interest as a therapeutic target for the treatment of obesity and its associated metabolic and vascular complications. In this context, previous works of our group revealed that the specific lack of insulin receptor (IR) in BAT (BATIRKO mice) leads to a loss of BAT mass (Guerra et al., 2001), brown fat lipoatrophy conferring obesity susceptibility together with vascular alterations such as vascular dysfunction and vascular insulin resistance (Gómez-Hernández et al., 2012).

On the other hand, it is well known that atherosclerosis is the major cause of cardiovascular disease. The progression of initial vascular lesions to more advanced plaques is a complex process where vascular smooth muscle cells (VSMCs) play a major role. In early stages, vascular injury results in changes in the VSMC environment, including increases in growth factor availability and cell alterations, leading to proliferation and migration of VSMCs and thereby to an organized atherosclerotic plaque (Johnson, 2014). In advanced stages, in which there is a high risk of acute cardiovascular events, one of the main mechanisms contributing to the instability of atherosclerotic plaques is the loss of VSMCs as a result of increased apoptosis (Littlewood y Bennett, 2003).

A further understanding of the molecular mechanisms involved in atherosclerosis is critical for identifying novel therapeutic strategies to limit disease progression before it leads to clinical consequences. In this regard, we have previously demonstrated that insulin receptor A isoform (IRA), and its association with IGF-I receptor (IGF-IR), confers a proliferative advantage to VSMCs in response to several proatherogenic stimuli (Gómez-Hernández et al., 2013). However, the role of IR isoforms and IGF-IR in the migration or apoptosis of VSMCs remained unknown.

Aims

The main aims of this thesis were as follows:

1. To investigate whether severe brown fat lipoatrophy aggravates the experimental atherosclerotic process.
2. To study the role of IR isoforms, IGF-IR and IR/IGF-IR hybrid receptors in early stages of atherosclerotic process.
3. To study the role of IR isoforms, IGF-IR and IGF-IIR in advanced stages of atherosclerotic process.

Methods and results

1. Severe brown fat lipoatrophy aggravates atherosclerotic process

To address the first objective, we generated a new mouse model lacking IR specifically in BAT and without apolipoprotein E (BATIRKO; ApoE^{-/-} mice) and studied five groups of mice (Control STD, Control WD, BATIRKO WD, ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD). Animals fed a standard diet (STD) or Western type diet (WD) for 18 weeks and were sacrificed at 24 weeks of age. To characterize the new mouse model, we studied BAT function and the main metabolic and lipid parameters. Both BATIRKO and BATIRKO; ApoE^{-/-} mice upon development show a severe brown fat lipoatrophy, characterized by a decrease of interscapular BAT mass, a marked eosinophilia in BAT and also a reduced brown adipocyte size. As a potential compensatory mechanism to brown fat lipoatrophy, the levels of UCP-1 and other thermogenic markers (PRDM16, FGF21 y PGC-1 α) were increased in BAT from BATIRKO; ApoE^{-/-} WD mice.

We assessed that brown fat lipoatrophy conferred susceptibility to obesity in BATIRKO; ApoE^{-/-} WD mice, as we found an increased visceral adiposity, mainly in the gonadal depots. Moreover, magnetic nuclear resonance imaging revealed that BATIRKO; ApoE^{-/-} WD mice presented a significant increase of body fat volume. Cholesterol and triglycerides plasma levels were elevated in both ApoE^{-/-} and BATIRKO; ApoE^{-/-} WD mice. More importantly, we observed that triglycerides levels in BATIRKO; ApoE^{-/-} WD were significantly higher than those obtained in ApoE^{-/-} WD mice. Brown fat lipoatrophy is also associated to alterations in glucose metabolism. Thus, BATIRKO; ApoE^{-/-} mice showed an elevated postprandial hyperglycemia, a marked hypoinsulinemia and severe glucose intolerance with certain degree of insulin resistance, together with a defect in the acute insulin secretion.

By Oil Red O staining, a marked liver steatosis was found in BATIRKO; ApoE^{-/-} WD mice versus ApoE^{-/-} mice. Moreover, we performed *in vivo* insulin signaling studies and observed a severe insulin resistance, as revealed by an impairment of Akt phosphorylation in liver from BATIRKO; ApoE^{-/-} WD mice. These results correlated with the elevation of hepatic TNF- α observed in BATIRKO; ApoE^{-/-} WD.

To assess whether brown fat lipotrophy could aggravate the atherogenic process, we studied the vascular damage in BATIRKO; ApoE^{-/-} and ApoE^{-/-} mice in a comparative manner. Thus, aortic roots from BATIRKO; ApoE^{-/-} mice presented a very significant increase of stenosis, lesion area and lipid content. By immunohistochemistry, we also observed that BATIRKO; ApoE^{-/-} had higher macrophage infiltration and expression of iNOS in aortic roots. Furthermore, by qRT-PCR we found that aorta from BATIRKO; ApoE^{-/-} mice showed a significant increase of gene expression involved in atherogenic process, such as ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- α , PAI-1 and IGF-IR. However, eNOS mRNA expression was notably reduced in aorta artery from BATIRKO; ApoE^{-/-} mice, favoring the loss of NO-dependent vasodilatation.

In addition to primary insulin resistance in BAT, as a result of the lack of IR in this tissue, we found a secondary insulin resistance in aorta, gonadal WAT (gWAT), and thoracic PVAT (tPVAT) from BATIRKO; ApoE^{-/-} WD mice.

Finally, we hypothesized that the increased visceral adiposity might affect the expression of the proinflammatory adipocytokines responsible for associated metabolic and vascular alterations. To address this issue, we analyzed by qRT-PCR the expression of TNF- α , leptin and adiponectin in BAT and several components of WAT. A significant increase of TNF- α mRNA expression in BAT, gWAT and tPVAT was observed in BATIRKO; ApoE^{-/-} mice. Leptin mRNA levels were significantly increased in gWAT and tPVAT and adiponectin mRNA levels were significantly decreased in visceral WAT (gWAT and rpWAT) and tPVAT from BATIRKO; ApoE^{-/-} mice.

2. Role of IR isoforms, IGF-IR and IR/IGF-IR hybrid receptors in early stages of atherosclerotic process

To address the second aim, we studied the effect of insulin or IGFs on VSMC migration, as well as the contribution to this process of IR isoforms, IGF-IR and IR/IGF-IR hybrid receptors. Thus, wound healing assays were performed in murine aortic VSMCs bearing IR (IRLoxP^{+/+} VSMCs), or not (IR^{-/-} VSMCs), expressing IRA isoform (IRA VSMCs) or expressing IRB (IRB VSMCs). IGF-I strongly induced migration of all cell lines, including IR^{-/-} VSMCs, suggesting that the effect of IGF-I is mediated mainly through IGF-IR. In contrast, insulin and IGF-II seem to require IR, and more specifically IRA isoform, to induce VSMC migration, since they only stimulated migration in IRA VSMCs at 12 and 24 hours after wounding. Picropodophyllin (PPP), a highly specific inhibitor of IGF-IR tyrosine phosphorylation, caused a notable and significant decrease of VSMC migration in basal conditions. Furthermore, we observed that IGF-IR inhibition abolished insulin- and IGF-II-induced migration in IRB VSMCs, whereas migration of IRA VSMCs was partially inhibited. However, IGF-I-stimulated migration was inhibited by PPP at a similar level in both IRA and IRB cell lines.

All cell lines showed a basal association between IR and IGF-IR. Nevertheless, expression of IRA/IGF-IR hybrid receptors was significantly increased only in IRA VSMCs upon stimulation with insulin or IGF-II, but not with IGF-I, for 12 hours. These findings are

consistent with the greater migration observed in IRA VSMCs stimulated with insulin or IGF-II.

We wondered whether some of the mechanisms studied *in vitro* could be of any *in vivo* relevance. For this purpose, we analyzed IRA, IRB and IGF-IR mRNA expression by qRT-PCR in aorta from ApoE^{-/-} mice at 8, 12, 18 and 24 weeks of age. A significant increase of IRA and IGF-IR mRNA was noted in 24-week-old ApoE^{-/-} mice. Conversely, IRB was diminished in aorta from ApoE^{-/-} mice at all weeks of age studied. By immunohistochemistry, protein levels of total IR in aortic roots from 24-week-old ApoE^{-/-} mice were similar to their controls. In addition to the increased IGF-IR mRNA levels, a significant increase of IGF-IR protein was observed in aortic roots from ApoE^{-/-} mice at 24 weeks of age. To localize VSMCs in aortic roots, we studied by immunofluorescence the expression of α -SMA, a well-known marker of smooth muscle cells. Thus, we observed medial VSMCs migrated into the intima of fibrous plaques from 24-week-old ApoE^{-/-} mice. Moreover, by double immunofluorescence, we found that those VSMCs present in fibrous plaques from 24-week-old ApoE^{-/-} mice expressed IR or IGF-IR.

Finally, we analyzed the mRNA expression of total IR, specifically IRA and IRB isoforms, IGF-IR and IGFs in the medial layer of human aortic segments bearing or not early atherosclerotic lesions. We found a marked and significant increase of IRA isoform in medial layer of aortas bearing fatty streaks or fibrolipidic lesions as compared to healthy aortas. Furthermore, IGF-IR, IGF-I and IGF-II mRNA expression was also notably higher in aortas bearing fatty streaks.

3. Role of IR isoforms, IGF-IR and IGF-IIR in advanced stages of atherosclerotic process

To assess the role of IR isoforms, IGF-IR and IGF-IIR in advanced atherosclerosis, we used atherosclerotic plaques from patients undergoing carotid endarterectomy, animal models of atherosclerosis (ApoE^{-/-} and BATIRKO; ApoE^{-/-} mice) and VSMC lines (IRLoxP^{+/+} and IR^{-/-} VSMCs).

Firstly, we analyzed by immunohistochemistry the expression of IR, IGF-IR, IGF-IIR and IGFs in three different regions (medial, fibrous and shoulder regions) of human atherosclerotic plaques. We found a significant increase of all those proteins in shoulder regions. To evaluate comparatively the expression of IR isoforms in complicated and uncomplicated carotid plaques, we performed consecutive immunoprecipitations of IRB and IRA isoforms. Thus, we observed a significant decrease of IRA isoform, together with an increase of IRB, in complicated plaques in relation to uncomplicated plaques. Moreover, we analyzed protein levels of IGF-IR and IGF-IIR in supernatants from the second immunoprecipitation of plaques. We found a reduced IGF-IR expression, while IGF-IIR was increased in complicated plaques. Furthermore, α -SMA expression was significantly increased in complicated atherosclerotic plaques, indicating a reduced VSMC content in those plaques.

In animal models, we studied the expression of IR, IGF-IR and α -SMA, as well as the presence of apoptotic cells in aortic roots from Control, ApoE^{-/-} and BATIRKO; ApoE^{-/-} mice at 24 weeks age under Western type diet or at 15 months of age under standard diet. IR

isoforms and IGF-IR mRNA levels were also evaluated in aorta from 24-week-old ApoE^{-/-} and BATIRKO; ApoE^{-/-} mice. Protein levels of IR in aortic roots were very similar between the different groups of animals from the two experimental models. However, gene expression of IRA isoform was significantly decreased, whereas IRB was increased in aorta from 24-week-old BATIRKO; ApoE^{-/-} WD mice. It correlated with the reduced IRA/IRB ratio observed in complicated carotid plaques. Regarding IGF-IR, both protein and mRNA levels were increased in BATIRKO; ApoE^{-/-} WD mice at 24 weeks of age. Consistent with the decrease of VSMCs observed in complicated carotid plaques, α -SMA expression was significantly reduced in aortic roots from 24-week-old BATIRKO; ApoE^{-/-} WD mice and 15-month-old BATIRKO; ApoE^{-/-} WD mice as compared to their respective controls. Additionally, these data correlated with a marked increase of apoptotic cells in aortic roots from those groups of mice.

By Western blot against cleaved caspase 3, we observed that IGF-IR inhibition by PPP induced apoptosis in the two VSMC lines studied. Moreover, caspase 3 activation stimulated by thapsigargin, a Ca²⁺/ATPase inhibitor that induces endoplasmic reticulum stress, was lower in IR^{-/-} VSMCs, probably due to the greater expression of IGF-IR in relation to IRLoxP^{+/+} VSMCs. Finally, pretreatment with IGF-I, but not with IGF-II, reduced the apoptosis induced by thapsigargin in both VSMC lines.

Conclusions

The conclusions derived from the current thesis are as follows:

1. Severe brown fat lipoatrophy confers susceptibility to obesity and leads to metabolic and vascular alterations that aggravate the atherosclerotic process.
2. IRA isoform and IGF-IR have a differential role in early and advanced atherosclerosis. In early stages, overexpression of those receptors may favor proliferation and migration of vascular smooth muscle cells, contributing to atherosclerotic progression. Conversely, in advanced stages they prevent plaque instability and, thereby, reduce the risk of plaque rupture and its clinical consequences.

1. Introducción

1.1 Aterosclerosis

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en todo el mundo (Murray y López, 2013), siendo la aterosclerosis la principal causa de esta morbilidad. La aterosclerosis es una enfermedad progresiva caracterizada por la formación de engrosamientos focales asimétricos, conocidos como placas de ateroma, de la capa más interna de las arterias, la íntima. La placa de ateroma está formada por un depósito lipídico recubierto por tejido conectivo y distintos tipos de células, tales como células de músculo liso vascular (VSMCs), leucocitos (monocitos que pueden diferenciarse a macrófagos, neutrófilos y linfocitos T), además de eritrocitos y plaquetas (Sary *et al.*, 1994; Sary *et al.*, 1995).

El desarrollo de la lesión aterosclerótica es consecuencia de una respuesta inflamatoria del endotelio vascular que conduce, en una primera fase, a una disfunción endotelial y a la formación de la denominada estría grasa y, posteriormente, a la progresión de la lesión con el engrosamiento de la íntima (Bentzon *et al.*, 2014). La oclusión del vaso y la rotura de la placa son los dos principales procesos que dan lugar a eventos clínicos, como el infarto de miocardio o el ictus (Aikawa y Libby, 2004).

1.1.1 Estructura y función de la pared vascular

Las arterias sanas están formadas por tres capas concéntricas (**Figura 1.1**) (Aaronson *et al.*, 2012):

- **Túnica íntima:** compuesta por una monocapa de células endoteliales (endotelio), es la capa más interna del vaso en contacto con el torrente sanguíneo. Las estrechas uniones entre las células endoteliales limitan la difusión de moléculas de gran tamaño a través del endotelio. Las células endoteliales desempeñan un papel crucial en el control de la permeabilidad vascular, vasoconstricción, angiogénesis y regulación de la homeostasis. El endotelio se apoya en una capa subendotelial de tejido conjuntivo que puede contener algunas VSMCs de manera dispersa.
- **Túnica media:** se encuentra separada de la íntima por la lámina elástica interna, una membrana perforada y formada principalmente por elastina. La capa media está constituida por células de músculo liso integradas en una matriz de fibras de colágeno, elastina y proteoglicanos. Las VSMCs son células metabólicamente muy activas y responsables de la síntesis de los

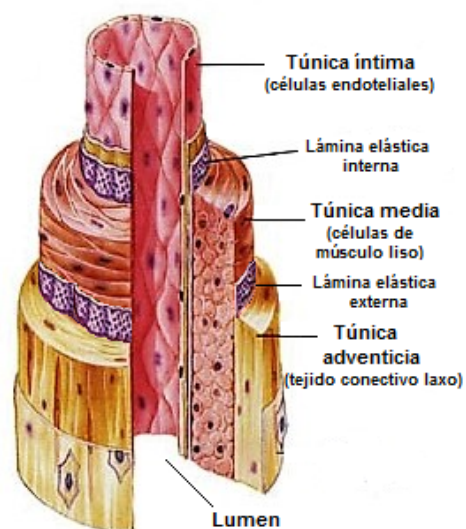


Figura 1.1 Estructura de la pared arterial. Esquema que muestra las tres capas concéntricas de la pared arterial (túnicas íntima, media y adventicia).

componentes de la matriz extracelular. Están orientadas circularmente de forma que al contraerse se produce la reducción del lumen vascular.

- Túnica adventicia: la capa más externa, separada de la media por la lámina elástica externa, está formada por tejido conjuntivo laxo que soporta fibroblastos y nervios. En los vasos sanguíneos de gran calibre, la adventicia contiene *vasa vasorum*, pequeños vasos que penetran en la porción externa de la media y proveen a la pared vascular de oxígeno y nutrientes.

1.1.2 Disfunción endotelial y formación de la estría grasa

Actualmente la teoría más aceptada para explicar la formación de la placa de ateroma es la descrita por Ross (Ross, 1999) que considera la aterosclerosis como una respuesta inflamatoria a una agresión del endotelio vascular causada por diversos estímulos. Esta lesión del endotelio puede ser mecánica pero también funcional, estableciéndose el concepto de disfunción endotelial.

La disfunción endotelial, entendida como la pérdida de la función adecuada del endotelio, es el primer evento clave en el inicio del proceso aterosclerótico. Entre las posibles causas de disfunción endotelial se encuentran las lipoproteínas de baja densidad (LDL) modificadas, radicales libres producidos por el humo del tabaco, hipertensión, hiperglucemia, o incluso factores externos como ciertos productos bacterianos. Estos factores pueden inducir pequeños cambios en la continuidad de la barrera endotelial, aumentando su permeabilidad a lípidos y leucocitos (Ross, 1999). Las LDL tienen especial importancia en este primer evento que conduce a la formación de la estría grasa, ya que son capaces de atravesar la barrera endotelial y acumularse en la zona subendotelial donde pueden ser modificadas por oxidación y agregación (Steinberg y Witztum, 2010). La retención de las LDL en el espacio subendotelial, que se produce gracias a su interacción con proteoglicanos de la matriz extracelular, se ve incrementada cuando las concentraciones plasmáticas de LDL son elevadas (Tabas *et al.*, 2007), favoreciendo su oxidación por radicales libres liberados por las células endoteliales, macrófagos y VSMCs (Steinberg, 1997). Las LDL oxidadas pueden activar el endotelio e inducir la expresión de moléculas de adhesión celular y factores quimiotácticos, como la proteína quimiotáctica para monocitos 1 (MCP-1), incrementando así la adhesión y migración de los leucocitos circulantes hacia la región subendotelial (**Figura 1.2**).

Una vez dentro de la íntima, los monocitos son expuestos a diversos factores secretados por las propias células endoteliales y por las VSMCs que estimulan su diferenciación a macrófagos (Libby, 2002). Los macrófagos diferenciados, junto con las VSMCs, expresan receptores *scavenger*, como el receptor *scavenger* A (SR-A) o el clúster de diferenciación 36 (CD36), que reconocen las LDL oxidadas y promueven su internalización al citoplasma celular donde el colesterol es hidrolizado, reesterificado y almacenado en gotas lipídicas (**Figura 1.2**). La acumulación de estas células cargadas de lípidos, conocidas como células espumosas, da lugar a la formación de la estría grasa, la primera lesión de la pared vascular detectable macroscópicamente (Sary *et al.*, 1994).

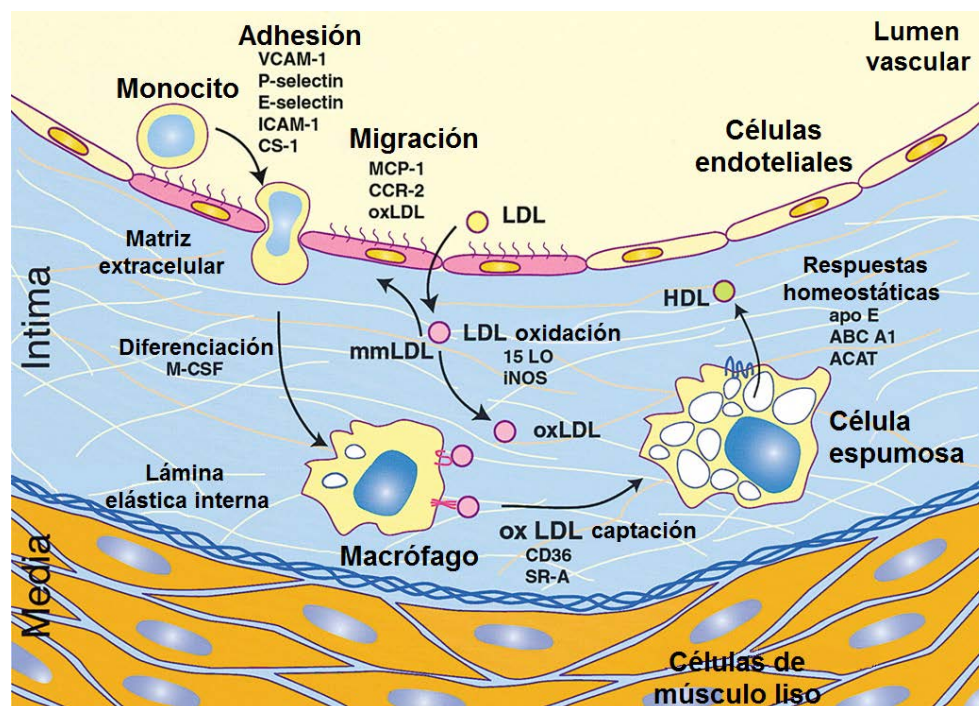


Figura 1.2 Mecanismos implicados en el desarrollo de la estría grasa. Las LDL sufren progresivamente modificaciones oxidativas en el espacio subendotelial, desde LDL mínimamente modificadas (mmLDL) hasta LDL oxidadas (oxLDL). Los monocitos circulantes son atrapados por las células endoteliales que expresan moléculas de adhesión inducidas por las mmLDL y citoquinas inflamatorias. Los monocitos adheridos migran al espacio subendotelial donde se diferencian a macrófagos. La captación de oxLDL a través de los receptores *scavenger* conduce a la formación de células espumosas. El colesterol procedente de las oxLDL es esterificado y almacenado en gotas lipídicas, o incorporado a HDL que son exportadas al exterior celular a través de receptores de colesterol como ABC-A1. Figura adaptada de Glass y Witztum, 2001.

1.1.3 Progresión de la lesión ateroesclerótica

Cuando la respuesta inflamatoria no es neutralizada de forma eficaz, se produce un mayor daño del endotelio que incluso puede ir acompañado de citólisis. En esta fase del proceso ateroesclerótico, que conduce al desarrollo de una lesión más compleja, tienen lugar interacciones entre los monocitos/macrófagos y los linfocitos T, desencadenando una amplia variedad de respuestas celulares y humorales que lleva a la adquisición de un estado inflamatorio crónico. De esta forma, los linfocitos y los macrófagos son activados y secretan citoquinas proaterogénicas que actúan sobre las células endoteliales y las VSMCs de la pared vascular (Glass y Witztum, 2001). Las VSMCs de la capa media migran hasta la íntima donde son capaces de proliferar y captar LDL modificadas, contribuyendo a la formación de células espumosas, y sintetizan proteínas de matriz extracelular, lo que da lugar a la formación de una placa fibrosa (**Figura 1.3**). La consecución de estos eventos implica un cambio fenotípico en las VSMCs de la media que las lleva a un estado menos diferenciado, adquiriendo así una

mayor capacidad de proliferación, migración y secreción de proteínas de matriz extracelular y citoquinas (Bennett *et al.*, 2016). Esta transición de las VSMCs de un fenotipo contráctil a uno sintético se considera fundamental en la progresión del proceso aterosclerótico, aunque también puede jugar un papel beneficioso en las lesiones avanzadas, en las que las VSMCs favorecen la estabilidad de la placa previniendo la rotura de la misma.

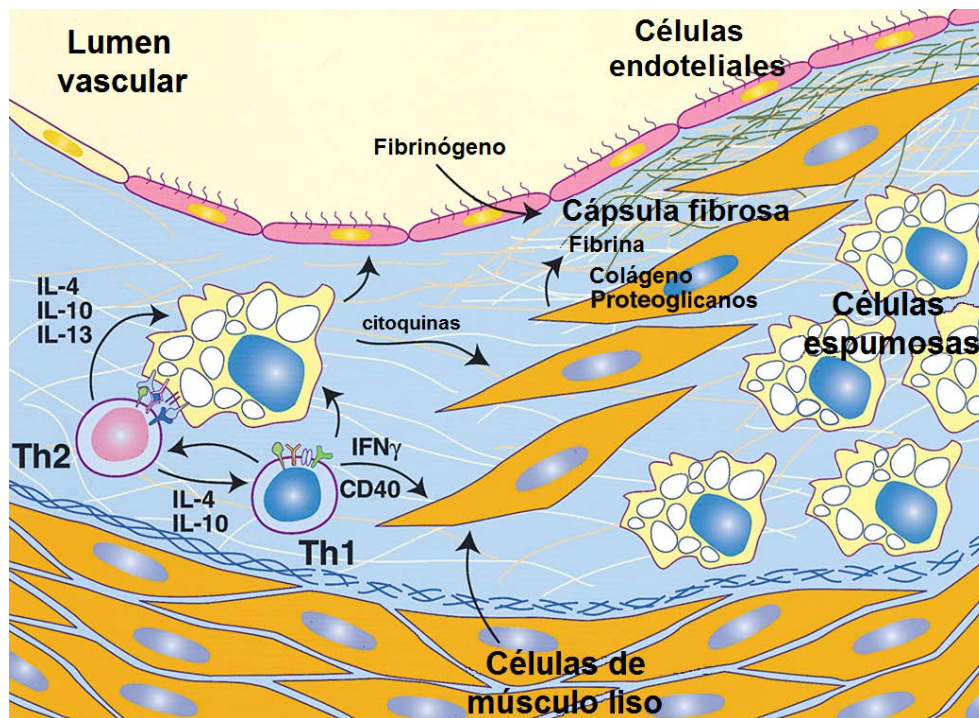


Figura 1.3 Progresión de la lesión aterosclerótica. Las interacciones entre las células espumosas y los linfocitos Th1 y Th2 desencadenan un proceso inflamatorio crónico. Las citoquinas secretadas por los linfocitos y los macrófagos ejercen efectos proaterogénicos sobre los distintos tipos celulares de la pared vascular. Las células de músculo liso migran desde la capa media, proliferan y secretan proteínas de matriz extracelular, dando lugar a la formación de una placa fibrosa. Figura adaptada de Glass y Witztum, 2001.

La captación continuada de LDL oxidadas provoca la apoptosis y posterior necrosis de las células espumosas, vertiendo su contenido lipídico al medio extracelular. La acumulación de lípidos extracelulares junto con detritos celulares forma un núcleo necrótico o lipídico recubierto por la cápsula fibrosa rica en colágeno, elastina y VSMCs (**Figura 1.4**), estructura característica de las lesiones avanzadas o fibroateromas (Bentzon *et al.*, 2014).

1.1.4 Rotura de la placa y trombosis

Aunque las lesiones ateroscleróticas avanzadas pueden conducir a síntomas isquémicos como resultado de la progresiva reducción del lumen vascular, los eventos cardiovasculares agudos como el infarto de miocardio o los accidentes cerebrovasculares son, generalmente, consecuencia de la rotura de la placa y la subsiguiente trombosis.

La rotura de la placa ocurre preferentemente en las zonas de la misma que son más delgadas y que presentan una mayor infiltración de macrófagos. En las placas excéntricas, el punto de mayor debilidad se encuentra en el margen de la cápsula fibrosa, a ambos lados del núcleo lipídico, y se conoce como región de los hombros (Bentzon *et al.*, 2014). El debilitamiento de la cápsula fibrosa implica dos mecanismos simultáneos (**Figura 1.4**). Uno de ellos es la pérdida gradual de VSMCs de la cápsula fibrosa debido a un aumento de su apoptosis. Así, se ha descrito que las cápsulas que han sufrido rotura contienen menos VSMCs y menos colágeno que las cápsulas intactas, y que estas células suelen estar ausentes en los sitios habituales de rotura de la placa (Kolodgie *et al.*, 2001; van der Wal *et al.*, 1994). Al mismo tiempo, los macrófagos infiltrantes secretan metaloproteinasas de matriz (MMPs) que degradan el colágeno de la cápsula fibrosa contribuyendo a la inestabilidad de la placa (Galis *et al.*, 1994).

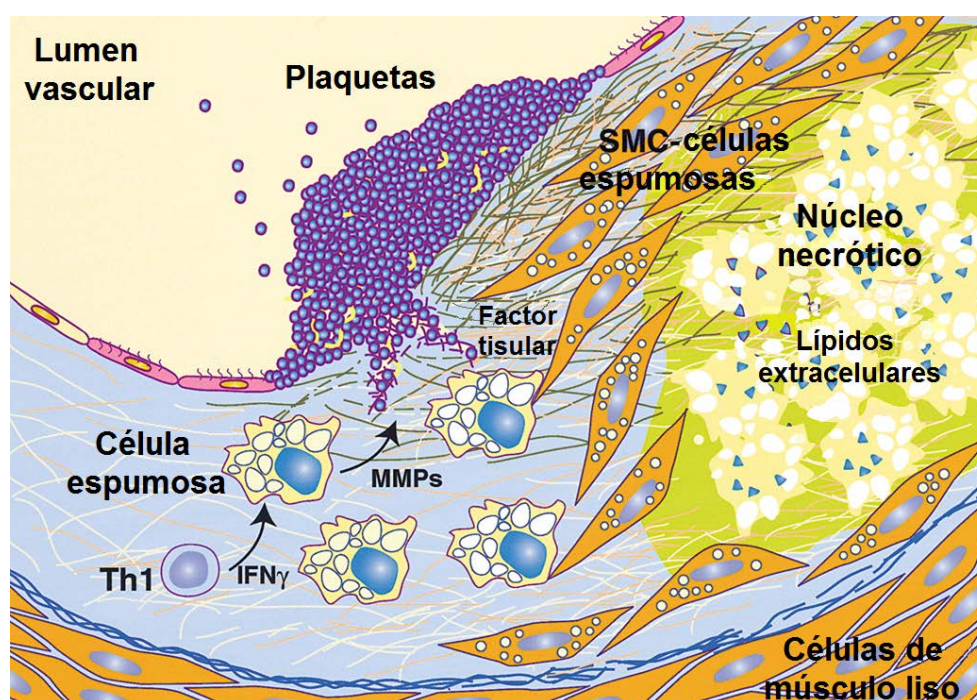


Figura 1.4 Rotura de placa y trombosis. La necrosis de las células espumosas conduce a la formación de un núcleo necrótico y a la acumulación de colesterol extracelular. La secreción de metaloproteinasas de matriz (MMPs) por los macrófagos y la neovascularización contribuye al debilitamiento de la placa fibrosa. La rotura de la placa expone los componentes de la sangre al factor tisular, iniciando la coagulación, el reclutamiento de plaquetas y la formación de un trombo. Figura adaptada de Glass y Witztum, 2001.

La neovascularización ha sido también asociada a la inestabilidad y rotura de placa. Cuando el aporte de oxígeno se ve restringido debido al excesivo engrosamiento de la pared vascular, se estimula la expresión de factores angiogénicos. Estos factores promueven la formación de nuevos vasos a partir de los *vasa vasorum* adventiciales hacia la íntima con el fin de proveerla de oxígeno y nutrientes, permitiendo así el crecimiento de la placa. En placas más avanzadas, la infiltración de células inflamatorias que liberan citoquinas proangiogénicas da lugar a una formación incontrolada de microvasos sin VSMCs que los soporten. Estos nuevos microvasos

son débiles y permeables y expresan moléculas de adhesión celular, favoreciendo la extravasación de eritrocitos, proteínas plasmáticas y células inflamatorias, lo que puede conducir a hemorragias intraplaca recurrentes que expanden el núcleo necrótico y aumentan la inflamación (Virmani *et al.*, 2005).

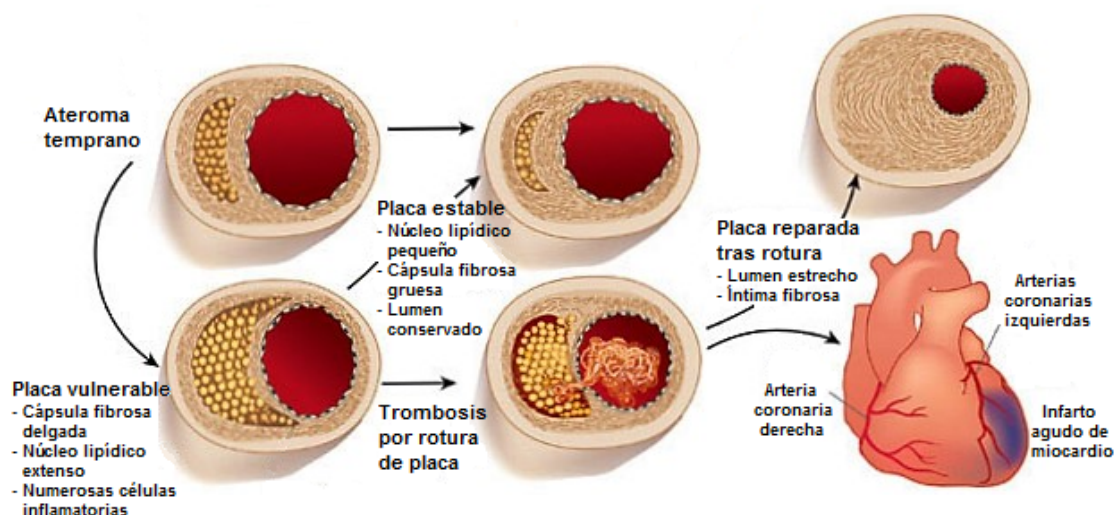


Figura 1.5 Esquema de la evolución de una placa aterosclerótica. En la aterogénesis temprana, el reclutamiento de células inflamatorias y la acumulación de lípidos conducen a la formación de un núcleo rico en lípidos. Si las condiciones inflamatorias y los factores de riesgo como la dislipidemia persisten, el núcleo lipídico puede crecer y las proteinasas secretadas por los leucocitos activados pueden degradar la matriz extracelular. Estos cambios debilitan la cápsula fibrosa haciéndola propensa a la rotura. La rotura de la placa conduce a la formación de un trombo que, si obstruye el vaso de forma persistente, puede resultar en un infarto agudo de miocardio. El trombo se puede reabsorber como resultado de la trombolisis endógena o terapéutica. Sin embargo, una respuesta de reparación inducida por la trombina puede estimular un mayor crecimiento de la íntima. Las lesiones estenosantes producidas por la invasión luminal de la placa fibrosa pueden restringir el flujo sanguíneo, sobre todo en situaciones de aumento de la demanda cardíaca, lo que lleva a la isquemia, provocando generalmente síntomas como la angina de pecho. Las placas fibrosas avanzadas son menos propensas a la rotura y la trombosis. La reducción del contenido de lípidos puede calmar la respuesta inflamatoria de la íntima, dando lugar a una placa más estable con una capa fibrosa gruesa y un lumen conservado. Figura adaptada de Libby, 2002.

La erosión o rotura de la placa expone las estructuras vasculares y los componentes del núcleo necrótico, junto con el factor tisular, a los factores trombogénicos de la sangre, desencadenando la cascada de la coagulación que lleva a la formación de una monocapa de fibrina y, simultáneamente, el reclutamiento de plaquetas circulantes y células inflamatorias (**Figura 1.4**). La interacción entre los componentes de la placa, los receptores de plaquetas y los factores de coagulación causa la activación y agregación plaquetarias que conducen finalmente a la formación del trombo (Badimon y Vilahur, 2014). La evolución de la lesión depende entonces del grado de estabilidad del trombo y de la capacidad de fibrinólisis local. Cuando el trombo obstruye el vaso de forma persistente pueden tener lugar eventos clínicos agudos como el infarto de miocardio. Sin embargo, si el trombo se reabsorbe como consecuencia de la trombolisis endógena o terapéutica, se desencadena una respuesta de reparación inducida por la trombina que lleva a un mayor crecimiento de la íntima. Estas

lesiones estenosantes pueden restringir el flujo sanguíneo, especialmente en situaciones de mayor demanda cardíaca, conduciendo a una isquemia que, generalmente, provoca síntomas como la angina de pecho (**Figura 1.5**).

1.1.5 Moléculas implicadas en la disfunción endotelial, inflamación y progresión de la lesión aterosclerótica

1.1.5.1 El óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es una pequeña molécula gaseosa que desempeña un papel clave en la regulación del sistema cardiovascular, además de ejercer otras funciones biológicas en el sistema nervioso o el sistema inmune. La síntesis del NO tiene lugar a partir del aminoácido L-arginina en una reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), siendo la L-citrulina el otro producto de la reacción. Esta reacción requiere la presencia de cuatro cofactores: nicotinamín-adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH), flavín-adenín dinucleótido en su forma oxidada (FAD), flavín mononucleótido oxidado (FMN) y tetrahidrobiopterina (BH₄). Para que la enzima sea activa tiene que producirse el acoplamiento entre dos monómeros, cada uno los cuales presenta un dominio con actividad oxigenasa y un dominio con actividad reductasa que actúan de manera independiente (Förstermann y Sessa, 2012).

En los mamíferos se han identificado tres isoformas de la NOS: neuronal (nNOS o NOS1), inducible (iNOS o NOS2) y endotelial (eNOS o NOS3). Clásicamente se ha considerado que la nNOS y la eNOS se expresan constitutivamente en el sistema nervioso y en el endotelio vascular, respectivamente, sintetizando una pequeña cantidad de NO de forma dependiente de calcio en condiciones basales y bajo estimulación, mientras que la iNOS solo se induce cuando es estimulada por endotoxinas bacterianas o ciertas citoquinas proinflamatorias, produciendo una mayor cantidad de NO de forma independiente de calcio (Förstermann *et al.*, 1994). Sin embargo, estudios más recientes muestran que la nNOS y la eNOS también están sujetas a la regulación de su expresión (Förstermann *et al.*, 1998; Nakata *et al.*, 2005; Tsutsui, 2004) y que la iNOS puede expresarse en condiciones fisiológicas (Buchwalow *et al.*, 2002; Park *et al.*, 1996).

El NO producido por el endotelio es un potente vasodilatador. Una vez liberado por las células endoteliales, difunde hasta el interior de las VSMCs donde estimula la guanilato ciclasa soluble (sGC) aumentando los niveles intracelulares de guanosín monofosfato cíclico (cGMP). El cGMP activa la proteína quinasa G que promueve la recaptación del calcio citosólico al retículo sarcoplásmico, la expulsión de calcio al exterior celular y la apertura de los canales de calcio activados por potasio, lo que resulta en una disminución de la concentración intracelular de calcio con la consiguiente relajación de las VSMCs (Zhao *et al.*, 2015). Además de su acción vasodilatadora, el NO en la pared vascular inhibe la adhesión de leucocitos y la inflamación, la proliferación de las VSMCs y la agregación plaquetaria (Förstermann y Sessa, 2012).

Una característica fundamental de la disfunción vascular es la pérdida de vasodilatación dependiente de endotelio, lo que se relaciona con la disminución de la biodisponibilidad del NO. Debido al aumento del estrés oxidativo, la degradación del NO se ve incrementada mediante su reacción con especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido (O_2^-), formando peroxinitrito ($ONOO^-$). Este radical causa peroxidación lipídica, incluyendo la oxidación de las LDL, y nitración de proteínas que afecta a su función y, por tanto, a la función del endotelio (Griendling y FitzGerald, 2003). Además, el peroxinitrito puede oxidar el cofactor BH_4 , lo que conduce al desacoplamiento de la eNOS convirtiéndola en una enzima disfuncional que sintetiza O_2^- , contribuyendo así al estrés oxidativo y al deterioro de la función vascular (Förstermann y Sessa, 2012).

1.1.5.2 La endotelina 1

La endotelina 1 (ET-1) es un péptido que, en condiciones fisiológicas, es producido en pequeñas cantidades por las células endoteliales principalmente, ejerciendo sus efectos a nivel autocrino y/o paracrino. Sin embargo, en condiciones patológicas se estimula su producción por distintos tipos celulares, tales como células endoteliales, VSMCs, cardiomiocitos y células inflamatorias. La expresión de la ET-1 está regulada transcripcionalmente por factores inductores como la angiotensina II, glucosa, insulina, trombina, citoquinas, factores de crecimiento o hipoxia, e inhibidores como el NO, la prostaciclina o el péptido natriurético auricular (Khimji y Rockey, 2010). La ET-1 ejerce sus efectos sobre el tono vascular mediante la activación de dos receptores diferentes, los receptores ET_A y ET_B . Aunque el receptor ET_A es predominante, ambos receptores están presentes en las VSMCs y su estimulación por la ET-1 produce vasoconstricción. Por el contrario, las células endoteliales únicamente expresan el receptor ET_B cuya activación conduce a un efecto vasodilatador vía liberación de NO. Además de estos efectos, la ET-1 promueve la proliferación de las VSMCs, estimula la síntesis de citoquinas por los macrófagos y la producción de anión superóxido (Pernow *et al.*, 2012). Todo ello se traduce en un incremento del tono vascular, el estrés oxidativo y la inflamación, contribuyendo a la pérdida de la función vascular.

1.1.5.3 La angiotensina II

El sistema renina-angiotensina ha sido considerado clásicamente un sistema hormonal que regula la presión y el flujo sanguíneos, el volumen de líquido extracelular y el balance electrolítico (Oparil y Haber, 1974a; 1974b). El angiotensinógeno producido por el hígado se convierte en angiotensina (Ang) I por acción de la renina que es secretada a la circulación por el riñón. La Ang I se transforma en Ang II mediante la enzima convertidora de angiotensina (ACE) que se encuentra distribuida principalmente en la circulación pulmonar. La interacción de la Ang II con uno de sus receptores específicos, el receptor AT_1 , produce vasoconstricción y liberación de aldosterona por las glándulas adrenales. Posteriormente se ha descrito que el sistema renina-angiotensina puede ser activado localmente en tejidos como el corazón (Cohn y Tognoni 2001; Yamagishi *et al.*, 1993), la pared vascular (Dzau, 2001; Ruiz-Ortega *et al.*, 2001), el riñón (Cheng *et al.*, 1995) y el cerebro (Morimoto *et al.*, 2002; Phillips y Summers, 1998).

En los mamíferos los dos receptores clásicos de angiotensina (AT_1 y AT_2) han sido identificados en la pared vascular, aunque se cree que el receptor AT_1 es el principal mediador de las acciones aterogénicas de la Ang II. Una gran densidad de este receptor se ha encontrado en las células endoteliales y las VSMCs que además expresan la ACE, de forma que el sistema renina-angiotensina puede ser activado localmente en las lesiones ateroscleróticas y en los vasos dañados (Sata y Fukuda, 2010). La Ang II en la pared vascular estimula la expresión de moléculas de adhesión (Tummala *et al.*, 1999), quimioquinas (Hernández-Presa *et al.*, 1997) y citoquinas (Han *et al.*, 1999), que contribuyen a la disfunción endotelial y a la inflamación. En lesiones ateroscleróticas avanzadas, induce la expresión de MMPs (Galis y Khatri, 2002) y de PAI-1 (Vaughan *et al.*, 1995), favoreciendo la desestabilización de la placa y la alteración del balance fibrinolítico, y promueve la angiogénesis al aumentar el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Williams *et al.*, 1995).

1.1.5.4 Moléculas de adhesión celular

Uno de los principales mecanismos implicados en la aterogénesis es el reclutamiento de leucocitos circulantes a la pared vascular, seguido de su migración hasta el espacio subendotelial. Este proceso está predominantemente mediado por moléculas de adhesión celular (CAMs), las cuales se expresan tanto en el endotelio vascular como en los leucocitos en respuesta a distintos estímulos aterogénicos (Li *et al.*, 1993; Tummala *et al.*, 1999; Albaugh *et al.*, 2004).

Las CAMs son glicoproteínas transmembrana localizadas en la superficie de muchos tipos celulares, que median interacciones célula-célula e interacciones célula-matriz extracelular. Actúan como receptores y mediante la unión a sus ligandos en la superficie de células vecinas o en la matriz extracelular permiten, entre otros procesos, la denominada cascada de adhesión leucocitaria que tiene lugar en el endotelio vascular (**Figura 1.6**). Las tres familias de CAMs que juegan un papel crucial en la patogénesis de la aterosclerosis son las selectinas, las integrinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas (Price y Loscalzo, 1999).

Las selectinas son responsables de la captura inicial y del rodamiento de los de leucocitos circulantes a lo largo de la superficie endotelial (McEver, 2015). Esta familia está formada por tres miembros denominados de acuerdo al tipo celular en el que fueron identificadas originalmente: E-selectina (endotelio), P-selectina (plaquetas) y L-selectina (leucocitos), aunque su localización no es exclusiva de estas células. La E-selectina no se expresa en condiciones fisiológicas, sino que se sintetiza y exporta a la superficie de las células endoteliales en situaciones de inflamación. La P-selectina se almacena en los gránulos α de las plaquetas y en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y se transloca rápidamente a la superficie celular en respuesta a trombina, histamina u otros estímulos. A diferencia de las anteriores, la L-selectina se expresa de forma constitutiva en la superficie de la gran mayoría de los leucocitos. En los últimos años, se ha descrito que las selectinas, y en particular la P-selectina, contribuyen a la inflamación patológica y a la trombosis durante el proceso aterosclerótico (Collins *et al.*, 2000; An *et al.*, 2008).

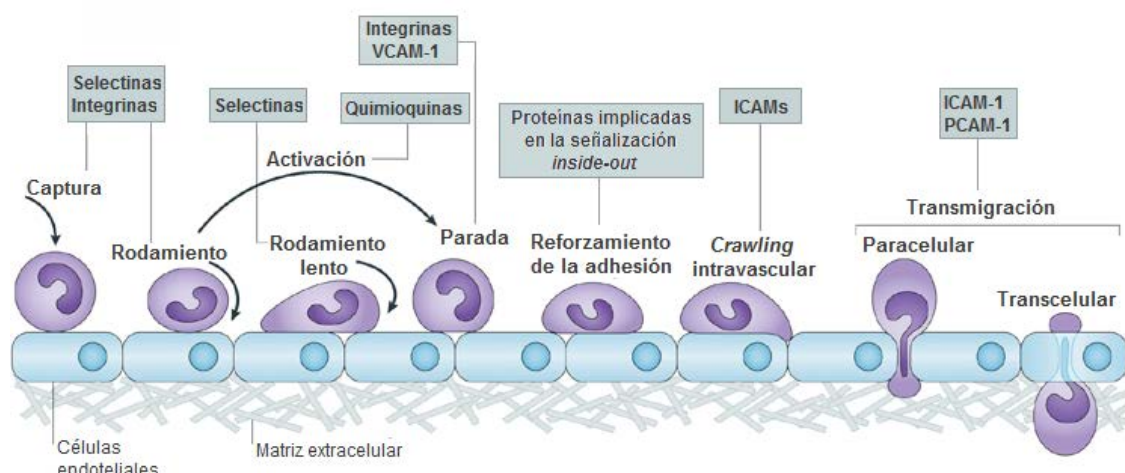


Figura 1.6 Esquema de la cascada de adhesión leucocitaria. La cascada de adhesión de leucocitos al endotelio vascular implica las fases de captura, rodamiento, rodamiento lento, parada, reforzamiento de la adhesión, *crawling* intravascular y migración transendotelial. Se pueden distinguir dos tipos de transmisión, paracelular y transcélular. Los cuadros superiores indican las moléculas implicadas en cada una de las fases. Figura adaptada de Ley *et al.*, 2007.

Aunque la fase de rodamiento es un requisito indispensable para que se produzca la adherencia completa del leucocito a la pared del vaso, la adhesión dependiente de selectinas no conduce a la adhesión firme y a la transmisión de los leucocitos a menos que intervenga otra familia de moléculas adhesión, las integrinas, que se unen a sus ligandos en la superficie de las células endoteliales. Las integrinas son proteínas transmembrana heterodiméricas compuestas por subunidades α y β unidas de forma no covalente (Hynes, 2002). Entre los miembros de la subfamilia $\beta 1$, la integrina $\alpha_4\beta_1$, que se expresa en los linfocitos, parece ser la más relevante en la aterosclerosis ya que ha sido implicada en la lesión isquémica cerebral (Becker *et al.*, 2001). Las integrinas $\beta 2$ se expresan exclusivamente en los leucocitos e interactúan con miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, como las ICAMs, para inducir la adhesión firme de los leucocitos al endotelio activado. Por último, la subfamilia $\beta 3$ de integrinas se expresa en las plaquetas e interviene en la adhesión y agregación plaquetarias.

La transmisión de leucocitos, el último paso en la cascada de adhesión leucocitaria, está mediado por ciertos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Estas moléculas son receptores de membrana glicoproteicos que presentan un número variable de dominios extracelulares similares a las inmunoglobulinas. La familia de las moléculas de adhesión intercelular (ICAMs) comprende cinco miembros, de los cuales las ICAM-1 e ICAM-2 están presentes en las células endoteliales y los leucocitos de forma constitutiva. Sin embargo, la expresión de la ICAM-1 se ve incrementada en presencia de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IFN- γ) y ROS (Hubbard y Rothlein, 2000), mientras que la expresión de la ICAM-2 es relativamente estable. La molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) se localiza mayoritariamente en las células endoteliales y su expresión es inducida por citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 o IL-4 (Swerlick *et al.*, 1992). Mediante su

unión a la integrina $\alpha_4\beta_1$, la VCAM-1 media la adhesión de linfocitos y monocitos, además de participar en la migración de leucocitos a través del endotelio (Chan y Aruffo, 1993). Otro miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas importante en la trans migración leucocitaria es la molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas 1 (PECAM-1), que se expresa a niveles relativamente bajos en los leucocitos y plaquetas pero a niveles elevados en el endotelio (Muller *et al.*, 1993).

1.1.5.5 Citoquinas y quimioquinas

En la aterosclerosis, considerada actualmente un proceso inflamatorio crónico, las respuestas inmunes innatas y adaptativas son dirigidas por una amplia gama de citoquinas que participan en las distintas etapas de la enfermedad. Las citoquinas son un conjunto diverso de proteínas de bajo peso molecular que se agrupan en distintas clases como las interleuquinas (IL), quimioquinas, factores de necrosis tumoral (TNF), interferones (IFN) o factores de crecimiento transformantes (TGF).

En las etapas iniciales del proceso aterosclerótico las citoquinas pueden modular la permeabilidad del endotelio. Por ejemplo, el IFN- γ y el TNF- α causan la reorganización del citoesqueleto de actina y tubulina en las células endoteliales abriendo espacios entre células adyacentes (Pober y Sessa, 2007). El endotelio activado es capaz de liberar una serie de citoquinas con actividad quimioatrayente (quimioquinas) responsables, junto con las moléculas de adhesión, del reclutamiento de leucocitos circulantes.

Las quimioquinas son una familia de citoquinas quimiotácticas estructuralmente relacionadas, que se dividen en subfamilias en base a la posición de sus dos primeros residuos de cisteína (CC, CXC, C, CX₃C) (Zernecke y Weber, 2010). Por lo general, una misma quimioquina puede unirse a múltiples receptores de quimioquinas y esta interacción activa proteínas G heterotriméricas y, en consecuencia, las vías de señalización asociadas. Las primeras evidencias de la contribución de las quimioquinas a la aterosclerosis derivaron de dos modelos animales de aterosclerosis. De esta forma, se vio que la delección genética de CCL2 (también conocida como MCP-1) o de su receptor CCL2R en ratones carentes del receptor de LDL (LDL^{-/-}) o de la apolipoproteína E (ApoE^{-/-}), respectivamente, protegía del desarrollo de lesiones ateroscleróticas al mismo tiempo que se reducía la infiltración de macrófagos (Boring *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 1998; Dawson *et al.*, 1999). Estudios posteriores han descrito que, además de MCP-1, otras quimioquinas de la subfamilia CC (CCL1, CCL3, CCL4 y CCL5) están presentes en lesiones ateroscleróticas (Zernecke y Weber, 2010). Dentro de la subfamilia CXC, destaca CXCL8 (IL-8) que se ha detectado en monocitos/macrófagos de lesiones ateromatosas (Wang *et al.*, 1996). Aunque originalmente se describieron en relación a su función de dirigir los leucocitos a los lugares de inflamación, actualmente se sabe que las quimioquinas también pueden jugar otros papeles importantes en la progresión de la aterosclerosis. Un ejemplo de ello es MCP-1 que ha sido implicada en la promoción de la migración de las VSMCs (Spinetti *et al.*, 2004) y en la progresión y desestabilización de placas ateroscleróticas estables (Inoue *et al.*, 2002).

Tras el reclutamiento de monocitos al interior de la íntima y su diferenciación a macrófagos, distintos tipos de citoquinas pueden participar en la activación de los mismos dando lugar a dos fenotipos principales de macrófagos (M1 y M2). Así, citoquinas tipo Th1 como el IFN- γ y la IL-1 β favorecen la formación de macrófagos M1 productores de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-12 o TNF- α), mientras que el fenotipo M2, que produce citoquinas anti-inflamatorias (IL-10 o TGF- β), requiere la presencia de citoquinas tipo Th2 como la IL-4 y la IL-13 (Chinetti-Gbaguidi *et al.*, 2015). También se ha descrito que ciertas citoquinas pueden modular la formación de células espumosas *in vivo*. Por ejemplo, el IFN- γ promueve la captación de LDL modificadas al inducir la expresión de receptores *scavenger* (Wuttge *et al.*, 2004).

La respuesta inflamatoria continuada conduce, en último término, a la desestabilización de la placa aterosclerótica mediante la acción de citoquinas proinflamatorias, las cuales intervienen en varios pasos clave del control de la estabilidad y rotura de placa. Algunas de ellas, como el IFN- γ , el TNF- α y la IL-1 β , favorecen la apoptosis de los macrófagos y células espumosas expandiendo el núcleo lipídico, así como la apoptosis de las VSMCs que conduce al debilitamiento de la cápsula fibrosa (Bentzon *et al.*, 2014). Otras inhiben la síntesis de componentes de la matriz extracelular que aportan estabilidad a la placa, como es el caso del IFN- γ que inhibe la síntesis de colágeno por las VSMCs.

1.1.5.6 Metaloproteinasas de matriz

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc que degradan el colágeno, la elastina, la fibronectina y otros componentes de la matriz extracelular. Aunque las MMPs son esenciales en procesos beneficiosos como el desarrollo y regeneración de órganos, angiogénesis o cicatrización, también están implicadas en procesos patológicos como el crecimiento tumoral, aterosclerosis, formación de aneurismas o hiperplasia de la neoíntima (Wang *et al.*, 2015). Su expresión por macrófagos, células endoteliales, VSMCs y otros tipos celulares está regulada a nivel transcripcional por factores de crecimiento, citoquinas, hormonas y promotores tumorales. Las MMPs se sintetizan y liberan en forma de proenzimas inactivas y su activación requiere la escisión proteolítica de una región denominada propéptido en el extremo N-terminal. Una vez activadas, la actividad de las MMPs está regulada por los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), de los que se han identificado cuatro en los humanos (TIMP-1-4).

Las MMPs juegan múltiples papeles en la patogenia de la aterosclerosis. La sobreexpresión local de MMPs en las zonas vulnerables de los hombros de ateromas humanos sugiere la participación de estas moléculas en la inestabilidad de la placa al debilitar la matriz extracelular en estas regiones (Galis *et al.*, 1994; Cipollone *et al.*, 2001). Además, las células espumosas de origen macrofágico, características de placas inestables, se han identificado como la principal fuente de MMPs, especialmente de MMP-2 y MMP-9, así como de su actividad asociada, en las lesiones ateroscleróticas (Galis *et al.*, 1995). Las MMPs han sido también implicadas en etapas tempranas del desarrollo aterosclerótico, como es el crecimiento de la íntima que está sustentado principalmente por VSMCs procedentes de la media. En este proceso, las MMPs

pueden catalizar la degradación de la membrana basal facilitando la migración y proliferación de las VSMCs. Así, estudios llevados a cabo en ratones carentes de la MMP-2 o la MMP-9 muestran la implicación de estas MMPs en la migración y proliferación de las VSMCs y, en consecuencia, en la formación de la neointima (Kuzuya *et al.*, 2003; Cho y Reidy, 2002; Johnson y Galis, 2004).

1.1.5.7 El inhibidor del activador del plasminógeno 1

La degradación de los coágulos de fibrina está mediada por la enzima plasmina, que se forma en la circulación sanguínea a partir del precursor inactivo plasminógeno. El paso de plasminógeno a plasmina tiene lugar por la acción de los activadores del plasminógeno tipo tisular (tPA) y tipo uroquinasa (uPA) y puede ser bloqueado por los inhibidores del activador del plasminógeno (PAI). PAI-1 es el principal inhibidor fisiológico de tPA y uPA y un importante regulador del sistema fibrinolítico (**Figura 1.7**). Se trata de una glicoproteína de cadena simple que pertenece a la familia de los inhibidores de serín-proteasas. Es sintetizada por las células endoteliales, VSMCs, monocitos/macrófagos, adipocitos, hepatocitos y plaquetas (Vaughan, 2005). La producción de PAI-1 por parte del endotelio puede ser estimulada por números factores, entre los que se incluyen citoquinas proinflamatorias, como IL-1 (Emeis y Kooistra, 1986) o TNF- α (Sawdey *et al.*, 1989), factores de crecimiento como TGF- β (Sawdey *et al.*, 1989), trombina (Dichek y Quertermous, 1989) o Ang II (Vaughan *et al.*, 1995). En cuanto al tejido adiposo, se ha observado una mayor secreción de PAI-1 en la grasa visceral que en la grasa subcutánea, lo cual podría relacionarse con el incremento de los niveles de PAI-1 observado en la obesidad central y con el desarrollo de alteraciones vasculares asociadas a la misma (Shimomura *et al.*, 1996).

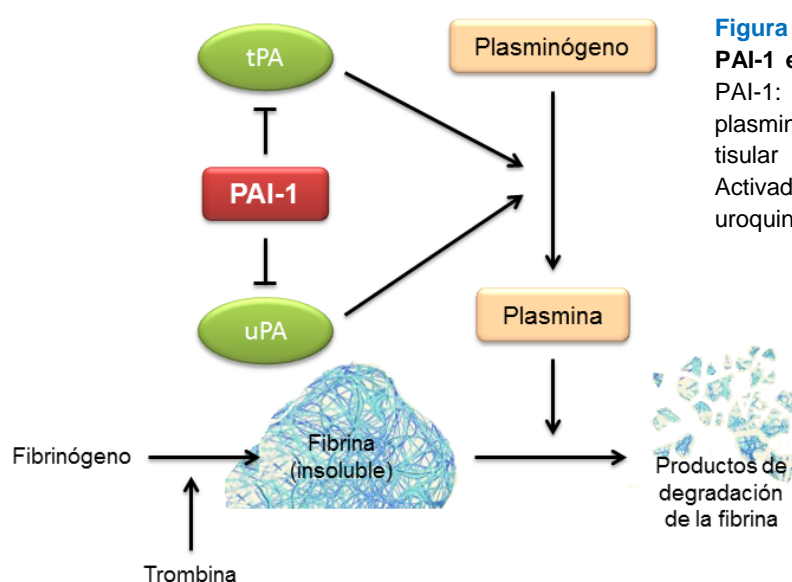


Figura 1.7 Esquema del papel de PAI-1 en el sistema fibrinolítico. PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno 1; tPA: Activador tisular del plasminógeno; uPA: Activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

En relación a su papel fisiopatológico, los niveles plasmáticos elevados de PAI-1 se han relacionado no solo con un mayor riesgo de sufrir eventos aterotrombóticos tras la rotura de la placa (Kohler y Grant, 2000), sino también con la progresión de la lesión vascular. Así, PAI-1 puede contribuir al desarrollo de la placa aterosclerótica estabilizando la matriz de fibrina, lo que favorece la migración de las VSMCs (Naito *et al.*, 1990), y estimulando la proliferación de las VSMCs (Escaned *et al.*, 1993) y la captación de las LDL al interior de la lesión (Smith y Cochran, 1990).

1.1.6 Modelos animales de aterosclerosis

El uso de animales de experimentación constituye una herramienta de gran utilidad para profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la aterogénesis, así como para evaluar la eficacia de nuevos tratamientos de la enfermedad. Algunos de los modelos animales de aterosclerosis que se han desarrollado en ratones, conejos, cerdos y primates no humanos se encuentran recogidos en la **Tabla 1.1**. Aunque también se han generado modelos de aterosclerosis en otras especies animales como perros (Geer y Guitry, 1965), hámsteres (Nistor *et al.*, 1987) o cobayas (Fernández y Volek, 2006), estos son mucho menos empleados debido a las limitaciones que presentan.

Los modelos murinos de aterosclerosis son actualmente los más utilizados y, puesto que los ratones *wild-type* son resistentes al desarrollo de lesiones ateroscleróticas, estos modelos se basan en modificaciones genéticas del metabolismo de las lipoproteínas junto con cambios en la dieta. Uno de ellos es el ratón carente del receptor de LDL (ratón LDLR^{-/-}), que representa un modelo de hipercolesterolemia familiar, la cual se debe a una mutación que afecta al receptor de LDL (LDLR), y cuyo perfil lipídico es similar al de los humanos. La ausencia del LDLR produce un menor aclaramiento de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y LDL circulantes y, como consecuencia, el ratón LDLR^{-/-} presenta un moderado aumento de los niveles plasmáticos de colesterol y un desarrollo lento de aterosclerosis en condiciones de dieta normal (Sanan *et al.*, 1998). No obstante, la severidad de la hipercolesterolemia y de las lesiones ateroscleróticas puede ser acelerada con una dieta de alto contenido en grasa o colesterol (Hartvigsen *et al.*, 2007), mediante la mutación del gen de la apolipoproteína B (ApoB) en una forma no editable (Véniant *et al.*, 1998), o mediante el cruce con el ratón transgénico para la ApoB100 humana (Sanan *et al.*, 1998). En estas condiciones, las lesiones en la aorta pueden progresar más allá del estadio de estría grasa hasta el estadio intermedio de lesión fibroproliferativa.

Otro modelo ampliamente utilizado en el estudio de la aterosclerosis es el ratón carente de la apolipoproteína E (ratón ApoE^{-/-}) generado en 1992 simultáneamente por dos grupos independientes mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias (Zhang *et al.*, 1992; Plump *et al.*, 1992). La deficiencia homocigótica de la apolipoproteína E (ApoE), principal componente proteico de los quilomicrones y las VLDL, resulta en un importante aumento de los niveles plasmáticos de VLDL y LDL debido a un fallo en el aclaramiento de estas lipoproteínas a través del LDLR y el receptor de proteínas relacionadas con LDL (LRP).

Tabla 1.1 Modelos animales de aterosclerosis

<i>Modelo</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Referencia</i>
Ratones		
Ratón ApoE ^{-/-}	Aterosclerosis espontánea con niveles plasmáticos elevados de VLDL	Zhang <i>et al.</i> , 1992; Plump <i>et al.</i> , 1992
Ratón LDLR ^{-/-}	Hipercolesterolemia y aterosclerosis con niveles plasmáticos elevados de LDL y VLDL, bajo dieta rica en grasa o colesterol	Sanan <i>et al.</i> , 1998
Ratón transgénico ApoE3-Leiden	Hipercolesterolemia y aterosclerosis con niveles plasmáticos elevados de colesterol, bajo dieta rica en colesterol	van Vlijmen <i>et al.</i> , 1994; Groot <i>et al.</i> , 1996
Ratón transgénico para ApoB100 humana	Aumento sustancial de los niveles plasmáticos de LDL	Greeve <i>et al.</i> , 1993
Ratón transgénico para CETP humana	Disminución de los niveles plasmáticos de HDL con grado de aterosclerosis variable	Föger <i>et al.</i> , 1999
Cruce del ratón transgénico para ApoB100 humana con el ratón LDLR ^{-/-}	Hipercolesterolemia y aterosclerosis severas	Sanan <i>et al.</i> , 1998
Cruce del ratón transgénico para CETP humana con el ratón transgénico para LCAT humana	Niveles plasmáticos de colesterol total bajos y reducida aterosclerosis	Föger <i>et al.</i> , 1999
Modelo quirúrgico del ratón ApoE ^{-/-}	Modelo para el estudio de placas ateroscleróticas inestables/rotas	Chen <i>et al.</i> , 2013
Conejos		
WHHL	Deficiente del LDLR, modelo de hipercolesterolemia familiar humana	Watanabe, 1980
STH	Modelo de hipertrigliceridemia e hiperlipidemia combinada humanas	Beaty <i>et al.</i> , 1992
Conejo transgénico para ApoB100 humana	Hiperlipidemia combinada con niveles plasmáticos de HDL reducidos	Fan <i>et al.</i> , 1995
Cerdos		
Mutaciones asociadas a lipoproteínas (Lpb5, Lpr1 y Lpu1)	Hipercolesterolemia y aterosclerosis sin necesidad de aporte dietético de colesterol	Prescott <i>et al.</i> , 1991
Primates no humanos		
Monos Rhesus	Aterosclerosis espontánea. Lesiones mayoritariamente en la arteria coronaria izquierda	Carey, 1978
Monos Cebus	Aterosclerosis espontánea. Lesiones en la bifurcación coronaria y en las arterias coronarias	Carey, 1978
Monos Cynomolgus y monos Verdes Africanos	Aterosclerosis espontánea. Lesiones en las arterias coronarias y en la aorta abdominal, respectivamente	Hollander <i>et al.</i> , 1979

CETP: Proteína transportadora de ésteres de colesterol; HDL: Lipoproteína de alta densidad; LCAT: Lecitin colesterol acil transferasa; LDL: Lipoproteína de baja densidad; LDLR: Receptor de lipoproteínas de baja densidad; STH: *St. Thomas' Hospital*; VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad; WHHL: *Watanabe Heritable Hyperlipidemic*.

El ratón ApoE^{-/-} presenta el espectro completo de lesiones observadas durante la aterogénesis y fue el primer modelo de ratón empleado para describir el desarrollo de lesiones similares a las que tienen lugar en los humanos. En condiciones de dieta normal, este modelo alcanza niveles plasmáticos de colesterol muy elevados y desarrolla extensas lesiones ateroscleróticas ampliamente distribuidas a lo largo de la arteria aorta, proceso que se ve agravado cuando los animales son alimentados con una dieta rica en grasa (Zhang *et al.*, 1994a; Nakashima *et al.*, 1994). Sin embargo, la principal limitación del modelo ApoE^{-/-} es que rara vez desarrolla rotura de placa o trombosis, dos de las complicaciones más comunes que tienen lugar en la aterosclerosis humana. El modelo de ratón transgénico ApoE3-Leiden expresa una forma mutante de la ApoE que tiene baja afinidad por el LDLR (van Vlijmen *et al.*, 1994; Groot *et al.*, 1996). Este ratón presenta menor hiperlipidemia que el modelo ApoE^{-/-} con dieta normal y desarrolla lesiones ateroscleróticas cuando es alimentado con dieta rica en grasa y colesterol. Las lesiones, que tienen características muy similares a las humanas, varían desde la estría grasa hasta las placas leves, moderadas y severas (Leppänen *et al.*, 1998).

El conejo es otra especie utilizada por muchos grupos de investigación como un modelo de aterosclerosis inducida por la dieta, ya que es muy sensible a la sobrecarga dietética de colesterol y comparte varios aspectos del metabolismo de las lipoproteínas con los humanos (Getz y Reardon, 2012). Además, se han identificado dos cepas de conejo, *Watanabe Heritable Hyperlipidemic* (WHHL) y *St. Thomas' Hospital* (STH), que presentan un defecto genético de forma natural y que se han utilizado como modelos de hiperlipidemia humana. Los conejos WHHL son deficientes del LDLR y se asemejan a la hipercolesterolemia familiar humana (Shiomi e Ito, 2009), mientras que los conejos STH constituyen un modelo de hipertrigliceridemia e hiperlipidemia combinada humanas (Beatty *et al.*, 1992). Se han generado también conejos transgénicos, por ejemplo, para la ApoB100 humana que manifiestan hiperlipidemia combinada con niveles reducidos de HDL (Fan *et al.*, 1995). Por otro lado, diferentes laboratorios han empleado cerdos para inducir aterosclerosis coronaria, aunque el desarrollo de lesiones avanzadas requiere una dieta con alto contenido en colesterol. Sin embargo, se ha identificado una cepa de cerdo con tres mutaciones asociadas a lipoproteínas (Lpb5, Lpr1 y Lpu1) que desarrolla hipercolesterolemia y aterosclerosis sin necesidad de aporte dietético de colesterol (Prescott *et al.*, 1991). Por último, la aterosclerosis y el metabolismo de las lipoproteínas también han sido estudiados en primates no humanos como los monos Rhesus, Cebus, *Cynomolgus* y monos verdes africanos (Getz y Reardon, 2012).

1.2 Obesidad

La obesidad se puede definir como una enfermedad crónica de origen multifactorial en la que el desequilibrio entre la ingesta y el consumo energético conduce a un incremento anormal de la grasa corporal. La incidencia de la obesidad ha aumentado en las últimas décadas en los países desarrollados hasta convertirse en la actualidad en una epidemia mundial (Ng *et al.*, 2014). En 2014 el 39 % de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso y el 13 % eran obesas (Organización Mundial de la Salud, 2016a). Constituye, además, un enorme problema de salud pública debido al riesgo de padecer otras patologías que lleva asociado. Así, el 44 % de los casos mundiales de diabetes, el 23 % de cardiopatía isquémica y el 7-41 % de determinados cánceres son atribuibles al sobrepeso y la obesidad (Organización Mundial de la Salud, 2016b). Esto es debido, al menos en parte, a la resistencia a la insulina inducida por la obesidad y el hecho de que el tejido adiposo no solo funciona como reservorio de energía sino también como un órgano endocrino secretor de hormonas, citoquinas y proteínas que afectan a la funcionalidad de las células y tejidos de todo el organismo (Mathieu *et al.*, 2010).

1.2.1 El órgano adiposo

En los mamíferos el órgano adiposo está compuesto por dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (WAT) y el tejido adiposo marrón (BAT), que poseen diferente morfología, distribución, expresión génica y función. El desarrollo de la obesidad depende, no solamente del equilibrio entre la ingesta y el consumo energético, sino también del balance entre los dos tejidos adiposos (Gesta *et al.*, 2007). El WAT es el principal reservorio energético y secreta numerosas hormonas y citoquinas que regulan una amplia variedad de procesos metabólicos. El BAT, sin embargo, está especializado en el gasto de energía en forma de termogénesis mediante la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP-1), que se localiza en la membrana mitocondrial interna y permite la disipación del gradiente de protones generado en la respiración en forma de calor.

1.2.1.1 El tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco (WAT) está compuesto por adipocitos con forma esférica y un tamaño variable que depende de la cantidad de lípidos almacenados en su interior. La principal característica de los adipocitos blancos es una única gota lipídica formada por triacilglicérols que ocupa el 90 % del volumen celular, desplazando el núcleo y el resto de orgánulos a un extremo del citoplasma. Las mitocondrias de los adipocitos blancos son delgadas y alargadas y están presentes en un número variable, generalmente menor en las células más grandes (Cinti, 2009). Además de adipocitos maduros, el WAT contiene preadipocitos, macrófagos, leucocitos, fibroblastos y células endoteliales. El WAT presenta, además de inervación simpática, una inervación sensorial que parece ser esencial en la regulación de la inervación simpática mediante circuitos de retroalimentación (Bartness y Ryu, 2015).

En los humanos, el WAT se organiza en dos compartimentos principales: el compartimento subcutáneo, que corresponde al tejido adiposo localizado debajo de la piel, y el compartimento visceral, formado por el tejido adiposo que recubre los distintos órganos. Desde hace años se conoce que el tejido adiposo subcutáneo y el visceral tienen diferentes características anatómicas, celulares y moleculares (Wajchenberg, 2000). Por ejemplo, presentan diferente irrigación y diferente capacidad de movilización de los ácidos grasos. En relación a esto último, la grasa visceral es más sensible al efecto lipolítico de las catecolaminas y menos sensible a los efectos antilipolíticos de la insulina, por lo que presenta una mayor capacidad de movilizar los ácidos grasos y liberarlos a la circulación portal que el reservorio subcutáneo (Björntorp, 1991).

Durante mucho tiempo se pensó que la única función del WAT era la de reservorio energético y, aunque a finales de los años ochenta se describió la secreción de hormonas esteroideas por parte de este tejido (Whitworth y Meeks, 1985), no es hasta 1994, con el descubrimiento de la leptina (Zhang *et al.*, 1994b), cuando se empieza a considerar un órgano endocrino. Posteriormente, se identificaron otros muchos factores liberados por el WAT (adipoquinas) con funciones autocrinas, paracrinas y endocrinas, que participan en procesos fisiológicos como la regulación del peso corporal (leptina, adiponectina), en la inflamación local generada en la obesidad (TNF- α , IL-6, IL-1 β), en la función vascular (Ang II, PAI-1) o en la reproducción (estrógenos) (Figura 1.8).

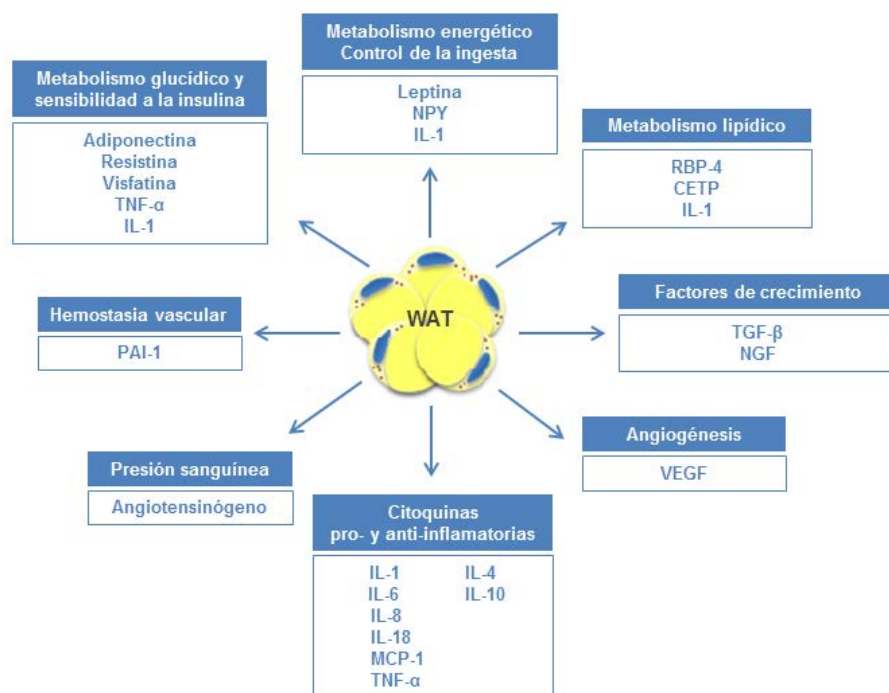


Figura 1.8 Procesos fisiológicos regulados por las adipoquinas secretadas por el WAT. CEPT: Proteína transportadora de ésteres de colesterol; IL-1: Interleuquina 1; IL-4: Interleuquina 4; IL-6: Interleuquina 6; IL-8: Interleuquina 8; IL-10: Interleuquina 10; IL-18: Interleuquina 18; MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1; NGF: Factor de crecimiento nervioso; NPY: Neuropéptido Y; RBP-4: Proteína de unión a retinol 4; TGF- β : Factor de crecimiento transformante; TNF- α : Factor de necrosis tumoral α ; VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

La leptina es una hormona secretada principalmente por los adipocitos que tiene un papel relevante en la regulación del peso corporal a través de sus efectos centrales sobre el apetito y periféricos sobre el gasto energético (Martí *et al.*, 1999). La gran mayoría de las personas obesas presenta concentraciones plasmáticas elevadas de leptina y su incremento se relaciona con el grado de adiposidad (Lönngqvist *et al.*, 1995), lo cual resulta coherente con la idea de que la resistencia a la leptina conduce a obesidad y, en consecuencia, a un aumento de los niveles plasmáticos de leptina (Caro *et al.*, 1996). Otra hormona secretada por los adipocitos que participa en el control de la ingesta es la adiponectina. Se ha descrito la presencia de hipoadiponectinemia en pacientes con obesidad, diabetes mellitus y enfermedad coronaria (Arita *et al.*, 1999; Hotta *et al.*, 2000). Además de su efecto antidiabetogénico y antiaterogénico, la adiponectina también se ha relacionado inversamente con otros factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, el colesterol total y las LDL (Pischon *et al.*, 2004; Ouchi *et al.*, 2001).

Entre las citoquinas secretadas por el WAT, destaca el TNF- α cuya expresión incrementada en el tejido adiposo de distintos modelos animales de obesidad y diabetes y de pacientes obesos se ha relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina (Hotamisligil, 2006). A pesar de que estimula la lipólisis e inhibe la lipoproteinlipasa, enzima que hidroliza los triglicéridos de las lipoproteínas, en un mecanismo encaminado a reducir el tamaño excesivo de los depósitos de grasa, altas concentraciones de TNF- α en el WAT estarían implicadas en dicha resistencia a la insulina mediante la inhibición de la ruta de señalización de la insulina (Hotamisligil *et al.*, 1994). El angiotensinógeno, precursor de la Ang II, y PAI-1 también son moléculas secretadas por los adipocitos (Van Harmelen *et al.*, 2000; Shimomura *et al.*, 1996), ejerciendo un efecto deletéreo sobre la función vascular.

1.2.1.2 El tejido adiposo marrón

El tejido adiposo marrón (BAT) está formado por adipocitos marrones que tienen forma poligonal y múltiples gotas lipídicas pequeñas (de ahí que se conozcan también como adipocitos multiloculares), un núcleo central rodeado por un citoplasma de gran tamaño y un elevado número de mitocondrias (**Figura 1.9**) (Cinti, 2009). Se trata de un tejido muy vascularizado e innervado por el sistema nervioso simpático, el cual representa el control central de la actividad del BAT. Al igual que el WAT, también presenta una innervación sensorial que parece ser necesaria para la producción de calor en respuesta a la exposición al frío (Bartness y Ryu, 2015).

El BAT es abundante en los roedores en los que aparece como pequeños depósitos principalmente localizados en las regiones interescapular, subescapular, axilar, peri-renal y peri-aórtica (Cinti, 2009). En los seres humanos las regiones cervical, supraclavicular, paravertebral, mediastinal y peri-renal constituyen los principales depósitos de BAT, pudiendo encontrar también adipocitos marrones en otras zonas dispersas, e incluso en el interior del WAT (Saito *et al.*, 2009). Aunque inicialmente se pensaba que el BAT solo estaba presente en los humanos durante el periodo neonatal, hoy se sabe que este tejido puede ser activado y ejercer un papel relevante en el metabolismo de individuos adultos (Cypess *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2009). Además, recientemente se ha descrito un nuevo linaje de células adiposas, conocidas como

adipocitos “beige” (**Figura 1.9**), con aspecto multilocular y elevada capacidad termogénica, que podría ser la principal fuente de células de BAT en los humanos (Sharp *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Aunque estos adipocitos derivan de un linaje diferente al de los adipocitos marrones clásicos, que proceden de células progenitoras Myf5+, su origen aún permanece en debate (Harms y Seale, 2013).

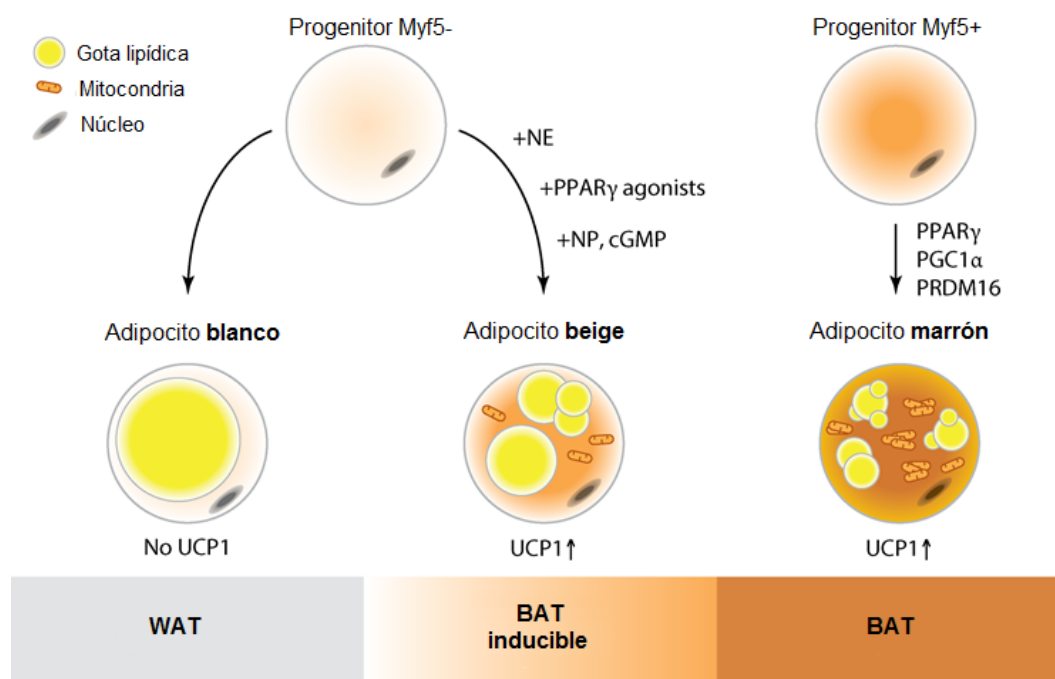


Figura 1.9 Los colores del tejido adiposo. Los adipocitos blancos provienen de un progenitor Myf5- y se caracterizan por presentar depósitos lipídicos uniloculares y por la ausencia de UCP-1. Los adipocitos beige también proceden de un progenitor Myf5-, expresan UCP-1 y pueden ser inducidos por ciertos estímulos, como se indica. Por el contrario, los adipocitos marrones clásicos derivan de un progenitor Myf5+, sus mitocondrias expresan UCP-1 y sus depósitos lipídicos son multiloculares. BAT: Tejido adiposo marrón; cGMP: Guanosín monofosfato cíclico; Myf5: Factor miogénico 5; NE: Norepinefrina; NP: Péptido natriurético; PGC-1α: Coactivador 1α del receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ; PPARγ: Receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ; PRDM16: Proteína con dominio PR 16; UCP-1: Proteína desacoplante 1; WAT: Tejido adiposo blanco. Figura adaptada de Pfeifer y Hoffmann, 2015.

El BAT está especializado en la producción de calor (termogénesis) y, más específicamente, en la termogénesis sin tiriteo que constituye un mecanismo adaptativo a ambientes fríos o a cambios en la dieta. La presencia de UCP-1 en la membrana mitocondrial interna de los adipocitos marrones es responsable de que la energía generada en la oxidación mitocondrial no se conserve mediante la formación de ATP sino que se disipa en forma de calor (Cannon y Nedergaard, 2004). La estimulación del BAT está mediada principalmente por el sistema nervioso simpático a través de la activación de los receptores adrenérgicos y, concretamente, los receptores adrenérgicos β3 parecen ser los más relevantes. Esto conduce a la activación de la lipólisis mediante la activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) y la fosforilación inhibitoria de la perilipina, lo que genera ácidos grasos libres que son utilizados como sustratos para la termogénesis.

Actualmente se reconoce que el BAT puede actuar como un órgano endocrino. Las principales adipoquinas secretadas por el WAT, como la leptina y la adiponectina, se expresan pobremente en el BAT, especialmente cuando este es activado en su función termogénica (Cannon y Nedergaard, 2004). Sin embargo, el BAT puede secretar otros factores que actúan de forma autocrina o paracrina (batoquinas). Uno de ellos es el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), requerido en la adaptación al frío y la estimulación adrenérgica, aunque también puede actuar directamente sobre los adipocitos marrones, independientemente del control adrenérgico (Hondares *et al.*, 2011). Otras proteínas secretadas por el BAT, como la adipsina, FGF2, IGF-I, prostaglandinas y la adenosina, desempeñan también funciones autocrinas. La secreción del factor de crecimiento nervioso (NGF), que se produce principalmente por la proliferación de preadipocitos marrones, promueve la innervación simpática del tejido, permitiendo a su vez una mayor estimulación de los adipocitos marrones (Sornelli *et al.*, 2009). Además del NGF, otros factores paracrinos sintetizados por el BAT son el VEGF, el angiotensinógeno y el óxido nítrico. La expresión de VEGF en el BAT permite el elevado nivel de vascularización de este tejido y es inducida por la noradrenalina y la exposición al frío (Tonello *et al.*, 1999). Por otro lado, tanto la iNOS como la eNOS se expresan en el BAT y la noradrenalina induce un aumento en la producción de NO, que inhibe la oxidación mitocondrial y promueve un rápido aumento en el flujo sanguíneo (Kikuchi-Utsuni *et al.*, 2002).

1.2.1.3 El tejido adiposo perivascular

El término tejido adiposo perivascular (PVAT) hace referencia al tejido adiposo presente alrededor de los vasos sanguíneos, independientemente de su localización. Algunas de las localizaciones de PVAT más conocidas son las arterias coronarias (tejido adiposo epicárdico), la aorta (tejido adiposo periaórtico) y el lecho microcirculatorio del mesenterio, músculo, riñón y tejido adiposo (Brown *et al.*, 2014). En los roedores, la arteria mesentérica está rodeada por WAT (tradicionalmente categorizado como WAT visceral), la aorta torácica por un tejido similar al BAT y la aorta abdominal por un tejido adiposo constituido por una mezcla de adipocitos blancos y marrones. Aunque en los humanos las características morfológicas del PVAT no han sido definidas tan bien como en los ratones, existen evidencias de que el PVAT humano presenta rasgos tanto de tejido adiposo blanco como marrón (Wu *et al.*, 2012).

En cuanto a su función, se ha descrito que, de forma similar al BAT, el PVAT aumenta el aclaramiento del colesterol plasmático en respuesta a la exposición al frío, pudiendo ejercer un importante papel protector en la patogénesis de la aterosclerosis (Chang *et al.*, 2012). El PVAT también es capaz de liberar adipoquinas, como la adiponectina, IL-6 o TNF- α , y presenta propiedades secretoras que difieren de otros tejidos adiposos. Su contacto directo con la pared vascular permite el intercambio paracrino de diversos factores entre las células adiposas perivasculares y células vasculares tales como los fibroblastos adventiciales, las VSMCs de la media y las células endoteliales de la íntima. De esta forma, las principales acciones endocrinas del PVAT sobre las células vasculares son la regulación del tono vascular en condiciones fisiológicas y el remodelado vascular en condiciones patológicas (Chang *et al.*, 2013). En relación a esto último, se ha descrito que las células inflamatorias presentes en el PVAT

podrían estar implicadas en el reclutamiento y proliferación de miofibroblastos, contribuyendo al remodelado vascular (Okamoto *et al.*, 2001). Además, estudios realizados en ratones muestran que la expresión de adipocinas proinflamatorias en el PVAT se ve incrementada en respuesta a un daño vascular o a una dieta rica en grasa, disminuyendo asimismo la expresión de la adiponectina (Takaoka *et al.*, 2010; Chatterjee *et al.*, 2009). En arterias coronarias humanas se ha visto que, en comparación con los tejidos adiposos subcutáneo y visceral, los adipocitos procedentes del PVAT están menos diferenciados y presentan un estado proinflamatorio (Chatterjee *et al.*, 2009). Por último, otra característica que diferencia al PVAT de otros depósitos adiposos es la mayor cantidad de factores angiogénicos liberados por este tejido, como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) que induce el crecimiento de las células endoteliales y la secreción de citoquinas por las VSMCs (Rittig *et al.*, 2012).

1.2.2 Complicaciones vasculares asociadas a la obesidad

La obesidad se ha asociado con una aterosclerosis acelerada y una mayor mortalidad cardiovascular (Mathieu *et al.*, 2010). Entre las posibles causas que pueden explicar esta relación entre la obesidad y la enfermedad aterosclerótica se encuentran la alteración del metabolismo lipídico, el desequilibrio en la producción de adipocinas, la resistencia a la insulina y la inflamación vascular (Berg y Scherer, 2005).

Se han descrito múltiples mecanismos por los cuales la obesidad influye en el metabolismo lipídico y de lipoproteínas (Yu y Ginsberg, 2005). En un estado de obesidad, la mayor liberación de ácidos grasos libres por el tejido adiposo, junto con un aumento del flujo de los mismos hacia el hígado, lleva a una mayor producción de VLDL, ApoE y triglicéridos. Otros factores secretados por el tejido adiposo también pueden causar efectos adversos en los lípidos circulantes. Por ejemplo, el TNF- α puede afectar al metabolismo lipídico mediante su acción paracrina sobre los adipocitos, así como su acción a nivel hepático.

Las adipocinas secretadas por el tejido adiposo también pueden tener un efecto directo sobre la pared vascular. La resistina, cuya expresión está incrementada en la obesidad, interviene en la activación del endotelio a través de la inducción de moléculas de adhesión, además de estimular la producción de ET-1 y MCP-1 por las células endoteliales (Verma *et al.*, 2003). Favorece también la formación de células espumosas al incrementar la expresión del CD36 en los macrófagos (Xu *et al.*, 2006) y la migración de las VSMCs (Kawanami *et al.*, 2004). Los niveles plasmáticos de leptina, que también están aumentados en personas obesas, se relacionan positivamente con complicaciones cardiovasculares. La leptina ejerce múltiples efectos sobre las células vasculares, muchos de los cuales son similares a los descritos para la resistina. En las células endoteliales, la leptina induce estrés oxidativo, aumenta la expresión de ET-1 y MCP-1 y promueve la proliferación (Bouloumie *et al.*, 1999; Yamagishi *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Quehenberger *et al.*, 2002); en las VSMCs, estimula la migración y proliferación (Shin *et al.*, 2005). También contribuye a la activación y producción de citoquinas por los macrófagos, neutrófilos y linfocitos T (Santos-Alvarez *et al.*, 1999; Martín-Romero *et al.*, 2000). Por último, la leptina promueve la calcificación de las células de la pared vascular (Parhami *et al.*, 2001) y facilita la trombosis al aumentar la agregación plaquetaria (Nakata *et al.*, 1999).

La adiponectina es otra molécula secretada por los adipocitos y sus niveles plasmáticos están disminuidos en los individuos obesos y diabéticos (Berg y Scherer, 2005). La adiponectina promueve un programa antiinflamatorio y antiaterogénico de expresión génica en las células vasculares. Así, disminuye la expresión de moléculas de adhesión y reduce el estrés oxidativo y la proliferación de las células endoteliales, mientras que estimula la actividad de la eNOS (Ouchi *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003; Motoshima *et al.*, 2004). Además, la adiponectina es capaz de reducir la proliferación las VSMCs y la expresión de receptores *scavenger* en los macrófagos (Arita *et al.*, 2002; Ouchi *et al.*, 2001).

La obesidad también conduce a un incremento en la producción de otros mediadores de inflamación por el tejido adiposo, como MCP-1, TNF- α e IL-6, (Berg y Scherer, 2005), lo que lleva a un estado inflamatorio sistémico que puede tener una enorme repercusión sobre la pared vascular contribuyendo al desarrollo de la aterosclerosis.

1.2.3 Papel potencial del tejido adiposo marrón en el tratamiento de la obesidad

En 2009 se describió por primera vez que en los seres humanos la cantidad de tejido adiposo marrón estaba inversamente relacionada con el índice de masa corporal, especialmente en personas de edad avanzada (Cypess *et al.*, 2009). Así, individuos con depósitos pequeños de BAT son más propensos a acumular WAT y aumentar su peso corporal, presentando un mayor riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas y vasculares asociadas a la obesidad. Es por ello que, en los últimos años, la capacidad termogénica del BAT en los humanos se ha puesto en el punto de mira como una posible diana en la prevención y tratamiento de la obesidad, así como de las complicaciones metabólicas y vasculares asociadas a la misma.

El incremento en la masa y/o actividad del BAT conduce a un aumento del gasto energético, lo que puede ser beneficioso en la prevención y tratamiento de la obesidad, y tiene, además, un efecto directo sobre el metabolismo glucídico y lipídico. Se ha visto en ratones que la exposición al frío puede aumentar el aclaramiento plasmático de triglicéridos al promover la captación de los mismos por el BAT (Bartelt *et al.*, 2011). En patologías que cursan con hiperlipidemia y resistencia a la insulina, la exposición al frío corrige la hiperlipidemia y mejora los efectos deletéreos de la resistencia a la insulina, ya que el BAT puede aclarar una porción importante del total de glucosa y triglicéridos circulantes cuando es activado (Stanford *et al.*, 2013). Además, el trasplante de BAT en la cavidad visceral de ratones mejora la tolerancia a la glucosa, aumenta la sensibilidad a la insulina y reduce el peso corporal y la masa de grasa (Stanford *et al.*, 2013), lo cual también puede ser atribuido a la secreción de factores por el BAT.

Algunos grupos de adipocitos beige con capacidad termogénica pueden ser identificados en el interior del WAT tras una exposición prolongada al frío o mediante la manipulación genética de vías de señalización específicas (Young *et al.*, 1984), proceso que se ha denominado “marronización” del WAT. En base a esto, la estimulación de la marronización se ha postulado como otro mecanismo conducente a incrementar la masa de BAT. Este proceso está regulado por una compleja interacción hormonal y factores ambientales como la

exposición al frío y el ejercicio (Kim y Plutzky, 2016). Recientemente, se ha descrito que cambios adaptativos en el músculo esquelético en respuesta al ejercicio inducen cambios en la producción y secreción de mioquinas, como la irisina, que estimulan la miogénesis y la marronización del WAT, con el consiguiente incremento del gasto energético (Rodríguez *et al.*, 2017). Además de con el ejercicio, la marronización del WAT se puede lograr mediante la activación simpática y el reclutamiento y activación de células inmunes, o mediante la acción directa sobre las células progenitoras de los adipocitos blancos o beige de factores tales como agonistas de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), FGF21, IL-6, péptidos natriuréticos, proteínas morfogénicas óseas (BMPs) o el ácido β -aminoisobutírico (BAIBA).

1.3 Resistencia a la insulina y diabetes tipo 2

1.3.1 La diabetes y sus complicaciones en la actualidad

La diabetes es una de las mayores emergencias mundiales de salud del siglo XXI. Cada año más y más personas viven con esta condición, que puede desencadenar complicaciones a lo largo de la vida. Actualmente se estima que hay 415 millones de personas con diabetes en el mundo y otros 318 millones tienen tolerancia a la glucosa alterada, lo que les coloca en alto riesgo de desarrollar la enfermedad. Si la prevalencia de la diabetes continúa aumentando, se prevé que en 2040 haya 642 millones de personas viviendo con la enfermedad (International Diabetes Federation, 2015).

Las personas diabéticas tienen un mayor riesgo de desarrollar numerosos problemas de salud incapacitantes y potencialmente mortales. Niveles de glucosa en sangre consistentemente elevados pueden llevar al desarrollo de enfermedad cardíaca y vascular, retinopatía, nefropatía o neuropatía periférica, además de a un mayor riesgo de desarrollar infecciones. La enfermedad cardiovascular es una de las causas principales de muerte entre personas con diabetes y puede representar un 50 % o más de muertes debido a la diabetes en algunas poblaciones.

1.3.2 Fisiopatología de la diabetes tipo 2 y la resistencia a la insulina

La diabetes es una enfermedad caracterizada por un aumento de la glucemia y está asociada a numerosas complicaciones, principalmente cardiovasculares, que reducen la calidad y la esperanza de vida. Existen dos tipos principales de diabetes que se diferencian esencialmente en su etiología. La diabetes tipo 1, que generalmente aparece en personas menores de 30 años, es una enfermedad autoinmune en la que la destrucción de las células β pancreáticas conduce a una deficiencia absoluta de la secreción de insulina (van Belle *et al.*, 2011). En cambio, la diabetes tipo 2 se caracteriza por un fallo en la acción y/o secreción de la insulina y, frecuentemente, va asociada a la obesidad y al envejecimiento.

En la diabetes tipo 2, la resistencia a la insulina se considera el evento inicial que lleva al desarrollo de la enfermedad. La resistencia a la acción de la insulina se traduce en una menor captación de glucosa por parte de los tejidos periféricos, así como en la alteración de la homeostasis lipídica. Son varios los tejidos que tienen un papel clave en el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes (**Figura 1.10**). El tejido adiposo blanco puede saturarse y provocar una redistribución anormal de los lípidos en otros tejidos (Samuel y Shulman, 2012). Además, produce una gran variedad de adipocinas (leptina, resistina, adiponectina, IL-6, TNF- α) que, como se ha mencionado anteriormente, ejercen un importante papel en el desarrollo de resistencia a la insulina. El músculo esquelético es el tejido que más glucosa consume del organismo y la menor captación de glucosa por parte de este tejido, como consecuencia de la resistencia a la insulina, es uno de los factores que más contribuye al desarrollo de hiperglucemia (Stumvoll *et al.*, 2005). El hígado es un órgano clave en el

mantenimiento de la homeostasis glucídica. Tras la ingesta, la insulina secretada por las células β pancreáticas actúa suprimiendo la producción hepática de glucosa. Sin embargo, cuando existe resistencia a la insulina en este tejido, se produce una disregulación de la gluconeogénesis hepática contribuyendo al desarrollo de hiperglucemia (Michael *et al.*, 2000).

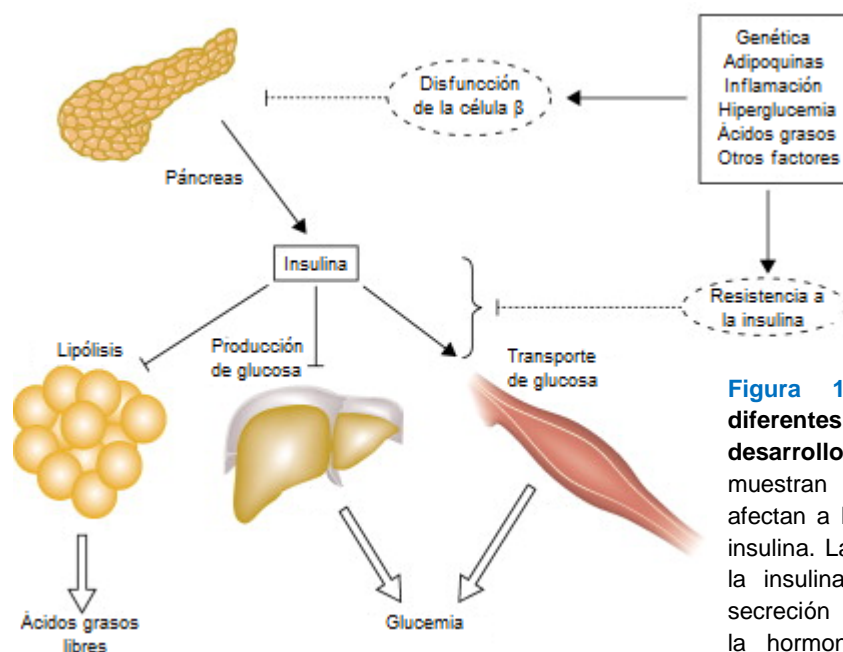


Figura 1.10 Esquema de los diferentes órganos implicados en el desarrollo de diabetes tipo 2. Se muestran los distintos factores que afectan a la secreción y acción de la insulina. La resistencia a la acción de la insulina y la disminución de su secreción reducen la señalización de la hormona en sus tejidos diana, conduciendo al aumento de los ácidos grasos circulantes y a la hiperglucemia de la diabetes. Figura adaptada de Stumvoll *et al.*, 2005.

En los estados de resistencia a la insulina o estados pre-diabéticos, los islotes pancreáticos responden incrementando la secreción de insulina para hacer frente a la falta de acción de la hormona en los tejidos (Prentki y Nolan, 2006). Este mecanismo compensatorio es posible gracias al aumento de la masa (hiperplasia) y del tamaño (hipertrofia) de las células β y da lugar a un estado de hiperinsulinemia que, a largo plazo, contribuye a agravar el desorden metabólico. El evento clave en la progresión desde la normoglucemia a la intolerancia a la glucosa y la diabetes manifiesta es el fallo de la célula β , que ya no es capaz de compensar la resistencia a la insulina (**Figura 1.11**).

De forma general, la regulación del metabolismo glucídico mediada por la insulina en los tejidos periféricos tiene lugar a través de la ruta de señalización IRS/PI3K/Akt, que será detallada más adelante. Proteínas implicadas en esta vía de señalización juegan un papel importante en los mecanismos moleculares que conducen al desarrollo de la resistencia a la insulina. Así, se han identificado individuos con resistencia a la insulina en los que la expresión del receptor de insulina (IR) estaba reducida o ausente (Taylor *et al.*, 1994; Foti *et al.*, 2005). Se han descrito también mutaciones del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) asociadas a resistencia a la insulina (Whitehead *et al.*, 1998), además de una mayor fosforilación de este sustrato en residuos de serina (Morino *et al.*, 2005), que lleva a una disminución de su

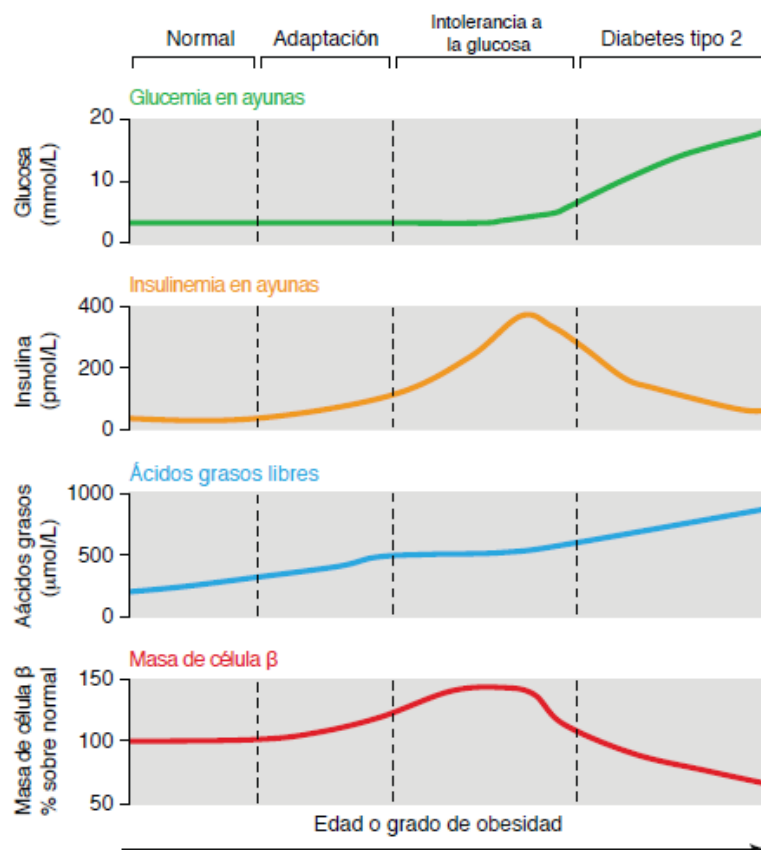


Figura 1.11 Progresión de la diabetes tipo 2. Evolución de los niveles de glucosa, insulina y ácidos grasos libres en sangre, así como de la masa de célula β durante la progresión a la diabetes. Figura adaptada de Lingohr *et al.*, 2002.

fosforilación en tirosina y, en consecuencia, a una deficiente señalización de la insulina. Distintos factores causan la fosforilación en serina de los IRS como, por ejemplo, los ácidos grasos libres circulantes o el $\text{TNF-}\alpha$ (White, 2002), que son liberados por el tejido adiposo en estados de obesidad e inflamación. Otras proteínas presentes más abajo en la cascada de señalización intracelular, cuya alteración se ha relacionado con la resistencia a la insulina, son la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), Akt o factores de transcripción de la familia *forkhead box* clase O (FoxO) (Saini, 2010).

1.3.3 Modelos animales de resistencia a la insulina

Los estudios genéticos en humanos sobre la predisposición a la resistencia a la insulina presentan limitaciones por las considerables variaciones de la carga genética humana y por la influencia de factores ambientales como una dieta inadecuada o el sedentarismo. Por esta razón, se han generado ratones transgénicos y *knock-out* que presentan mutaciones en genes implicados en la acción y/o secreción de la insulina.

Uno de los primeros modelos generados fue el ratón carente del receptor de insulina de forma constitutiva en todo el organismo. Aunque los animales llegaban a término sin defectos aparentes, morían a los pocos días del nacimiento por cetoacidosis severa (Accili *et al.*, 1996; Joshi *et al.*, 1996), lo que puso de manifiesto que el IR no es esencial para el desarrollo prenatal pero sí sumamente importante en la homeostasis metabólica durante la vida independiente. La

deleción del IRS-1 causaba en los ratones un retraso del crecimiento intrauterino y postnatal y una moderada intolerancia a la glucosa sin diabetes (Araki *et al.*, 1994; Tamemoto *et al.*, 1994). El ratón carente del IRS-2 desarrollaba diabetes debido a la combinación de deficiencia de insulina y resistencia a la acción de la misma, resultando una enfermedad letal en algunos *backgrounds* genéticos (Withers *et al.*, 1998) y más leve en otros (Kubota *et al.*, 2000). Al obtener el ratón doble heterocigoto para el IR y el IRS-1 (IR/IRS-1^{+/-}), con una reducción de aproximadamente el 50 % en la expresión de las dos proteínas, se observó resistencia a la insulina acompañada de hiperplasia de las células β e hiperinsulinemia compensatoria, llegando a desarrollar diabetes en torno al 40 % de los animales (Brüning *et al.*, 1997). Este fenotipo se agravaba en el triple heterocigoto IR/IRS-1/IRS-2^{+/-} (Kido *et al.*, 2000).

La proteína Akt media muchas de las acciones de la insulina esenciales para la homeostasis metabólica (transporte de glucosa mediado por GLUT4 en tejidos periféricos, síntesis de glucógeno, supresión de la gluconeogénesis hepática, etc.). Se trata de una serina/treonina quinasa que presenta 3 isoformas, siendo Akt2 la principal isoforma involucrada en las acciones metabólicas de la insulina. Se han descrito dos fenotipos en ratones carentes de Akt2: un fenotipo con alteraciones metabólicas debidas a la acción deficiente de la insulina en el hígado y en el músculo esquelético, pero insuficientes para causar diabetes manifiesta (Cho *et al.*, 2001); y otro caracterizado por retraso del crecimiento, disminución del tejido adiposo y diabetes (Garofalo *et al.*, 2003).

La captación de glucosa dependiente de insulina requiere la translocación del transportador GLUT4 desde un compartimiento intracelular a la membrana plasmática. El modelo *knock-out* para el GLUT4 presenta retraso del crecimiento, hipertrofia cardíaca, pérdida de tejido adiposo y moderada resistencia a la insulina (Katz *et al.*, 1995). Sin embargo, los ratones heterocigotos desarrollan resistencia a la insulina y diabetes (Stenbit *et al.*, 1997). Esto puede ser debido la existencia de transportadores de glucosa adicionales que pueden ser inducidos en el ratón sin GLUT4 pero no en el heterocigoto, conduciendo a un fenotipo compensatorio solamente en el primero.

1.3.3.1 Modelos animales carentes del receptor de insulina de forma específica de tejido

El fenotipo letal del modelo *knock-out* para el IR no permitía estudiar en detalle la función del receptor en los diferentes tejidos de los ratones adultos. Para vencer esta limitación se desarrollaron posteriormente otros modelos de ratón en los que la deleción del IR era específica de tejido (Kitamura *et al.*, 2003), recogidos en la **Tabla 1.2**. Estos modelos fueron generados mediante el sistema de recombinación Cre/LoxP que se basa en el reconocimiento por parte de la recombinasa Cre de dos secuencias cortas iguales que flanquean el fragmento genético a recombinar, denominadas secuencias LoxP. Para que la recombinación se produzca de forma específica de tejido el gen que codifica la recombinasa Cre se sitúa bajo el control de un promotor específico del tejido diana.

En los humanos el músculo esquelético es el mayor órgano consumidor de glucosa de forma dependiente de insulina. Para estudiar el papel del IR en el metabolismo del músculo y cómo afecta al desarrollo de diabetes, el grupo de Ronald Kahn generó en 1998 el modelo de ratón

knock-out para el IR específico de músculo (MIRKO). Este modelo presentaba una señalización de insulina deficiente y una disminución del transporte de glucosa dependiente de insulina, pero no desarrollaba resistencia a la insulina sistémica (Brüning *et al.*, 1998). Sin embargo, el ratón MIRKO desarrollaba un síndrome metabólico con incremento de los depósitos de grasa e hipertrigliceridemia. En el modelo β IRKO, la falta del IR en las células β resultaba en un defecto en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa, que conducía a una progresiva intolerancia a la glucosa y, en algunos animales, al desarrollo de diabetes manifiesta (Kulkarni *et al.*, 1999). Otro modelo generado mediante la tecnología Cre/LoxP es el modelo NIRKO, específico de neuronas nestina-positivas, que presentaba hiperfagia y obesidad moderada dependiente de la dieta, además de una fertilidad reducida como consecuencia de un hipogonadismo asociado a un defecto en la maduración de los folículos ováricos en las hembras y una reducida espermatogénesis en los machos (Brüning *et al.*, 2000). El modelo CIRKO, específico del tejido cardíaco, mostraba un menor tamaño de los cardiomiocitos y un metabolismo alterado propio de un corazón inmaduro (Belke *et al.*, 2002).

Tabla 1.2 Modelos animales *knock-out* para el receptor de insulina específicos de tejido

<i>Modelo</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>Referencia</i>
Global	Cetoacidosis diabética. Letal	Accili <i>et al.</i> , 1996; Joshi <i>et al.</i> , 1996
Músculo esquelético (MIRKO)	Adiposidad y dislipemia	Brüning <i>et al.</i> , 1998
Músculo/tejido adiposo	Intolerancia a la glucosa	Lauro <i>et al.</i> , 1998
Célula β (β IRKO)	Defecto en la secreción de insulina e intolerancia a la glucosa	Kulkarni <i>et al.</i> , 1999
Sistema nervioso central (NIRKO)	Hiperfagia y obesidad moderada. Fertilidad reducida	Brüning <i>et al.</i> , 2000
Hígado		
Constitutivo (LIRKO)	Resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa e hiperglucemia transitoria	Michael <i>et al.</i> , 2000
Inducible (iLIRKO)	Resistencia a la insulina severa e hiperinsulinemia. Progresión a la diabetes tipo 2	Escribano <i>et al.</i> , 2009
Tejido adiposo marrón (BATIRKO)	Defecto en la secreción de insulina	Guerra <i>et al.</i> , 2001
Adipocito (FIRKO)	Resistencia a la obesidad	Blüher <i>et al.</i> , 2002
Músculo cardíaco (CIRKO)	Reducción del tamaño y funcionalidad del corazón	Belke <i>et al.</i> , 2002
Endotelio vascular (VENIRKO)	Expresión alterada de mediadores de vasodilatación	Vicent <i>et al.</i> , 2003

La resistencia hepática a la insulina y, en especial, la pérdida de la capacidad de la insulina de inhibir la producción de glucosa por el hígado están íntimamente relacionadas con la hiperglucemia en ayuno característica de la diabetes tipo 2. La delección constitutiva del IR en el hígado (modelo LIRKO) resultaba inicialmente en una drástica resistencia a la insulina acompañada de una severa intolerancia a la glucosa y una marcada hiperinsulinemia (Michael *et al.*, 2000). Sin embargo, con la edad el fenotipo metabólico se volvía menos severo, llegando incluso a observar hipoglucemia en los animales de seis meses, probablemente debido a la disfunción hepática que desarrollaba el ratón LIRKO. Por el contrario, el modelo LIRKO inducible (iLIRKO) mostraba intolerancia a la glucosa crónica e hiperinsulinemia, así como un aumento inicial de la masa de células β y, en última instancia, el fracaso de las mismas para secretar suficiente insulina conduciendo a una diabetes incontrolada (Escribano *et al.*, 2009).

El modelo *knock-out* para el IR específico del endotelio vascular (VENIRKO) se generó para estudiar la implicación de la insulina en la función endotelial (Vicent *et al.*, 2003). En este modelo la homeostasis de la glucosa y el desarrollo vascular resultaron normales, pero se observaron alteraciones en la regulación de la presión sanguínea y en la expresión de la ET-1 y la eNOS. Más recientemente se ha desarrollado el modelo doble *knock-out* VENIRKO; ApoE^{-/-} que pone de manifiesto que la pérdida de señalización de la insulina en el endotelio acelera la aterosclerosis basal de los ratones ApoE^{-/-} (Rask-Madsen *et al.*, 2010).

1.3.3.2 El modelo BATIRKO

Uno de los modelos carentes del IR de forma específica tejido es el modelo BATIRKO, que fue generado en nuestro laboratorio en el año 2001 (Guerra *et al.*, 2001). Este ratón se obtuvo usando la tecnología recombinante Cre/LoxP, de manera que el exón 4 del IR estaba flanqueado por las secuencias LoxP y la recombinasa Cre se encontraba bajo el control del promotor de la UCP-1, logrando la delección del IR específicamente en el tejido adiposo marrón.

El modelo BATIRKO presentaba una lipoatrofia marrón severa e intolerancia a la glucosa dependiente de la edad sin resistencia a la acción de la insulina. Este fenotipo se debía a un defecto intrínseco en la secreción de insulina como consecuencia de una reducción en el tamaño de los islotes pancreáticos. Este modelo experimental sugería dos aspectos desconocidos hasta la fecha. El primero de ellos, el papel clave de la insulina y su receptor en la adipogénesis del BAT durante el desarrollo; y el segundo, la importancia del BAT en la regulación de la secreción de insulina y la homeostasis glucídica. Años más tarde, otro trabajo de nuestro grupo demostró que la lipoatrofia marrón severa confería susceptibilidad a la obesidad, caracterizada por un aumento de la adiposidad visceral y un estado inflamatorio que podría contribuir al desarrollo de las alteraciones metabólicas y vasculares observadas en el ratón BATIRKO (Gómez-Hernández *et al.*, 2012).

1.3.4 Complicaciones vasculares asociadas a la diabetes tipo 2

Las complicaciones vasculares de la diabetes se encuentran entre las manifestaciones más graves de la enfermedad. La aterosclerosis representa la mayor causa de reducción de la esperanza de vida en los pacientes diabéticos, mientras que la nefropatía y retinopatía diabéticas son las principales responsables de la enfermedad renal terminal y la ceguera, respectivamente (Rask-Madsen y King, 2013).

Los avances en el conocimiento de la patología vascular diabética han puesto de manifiesto que la patogénesis de las complicaciones vasculares de la enfermedad está determinada por el balance entre los mecanismos moleculares que conducen a la lesión vascular y los factores protectores endógenos (**Figura 1.12**). Ambos aspectos constituyen posibles dianas en la prevención de las complicaciones vasculares de la diabetes, incluso en situaciones de control metabólico deficiente. Actualmente las estrategias clínicas mejor establecidas incluyen la reducción intensiva de la glucemia, que disminuye el riesgo de nefropatía y retinopatía; el tratamiento antihipertensivo, que reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular, nefropatía y retinopatía; la fotocoagulación de la retina y fármacos anti-VEGF, que retrasan la progresión de la retinopatía diabética; y la terapia con estatinas, que disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular.

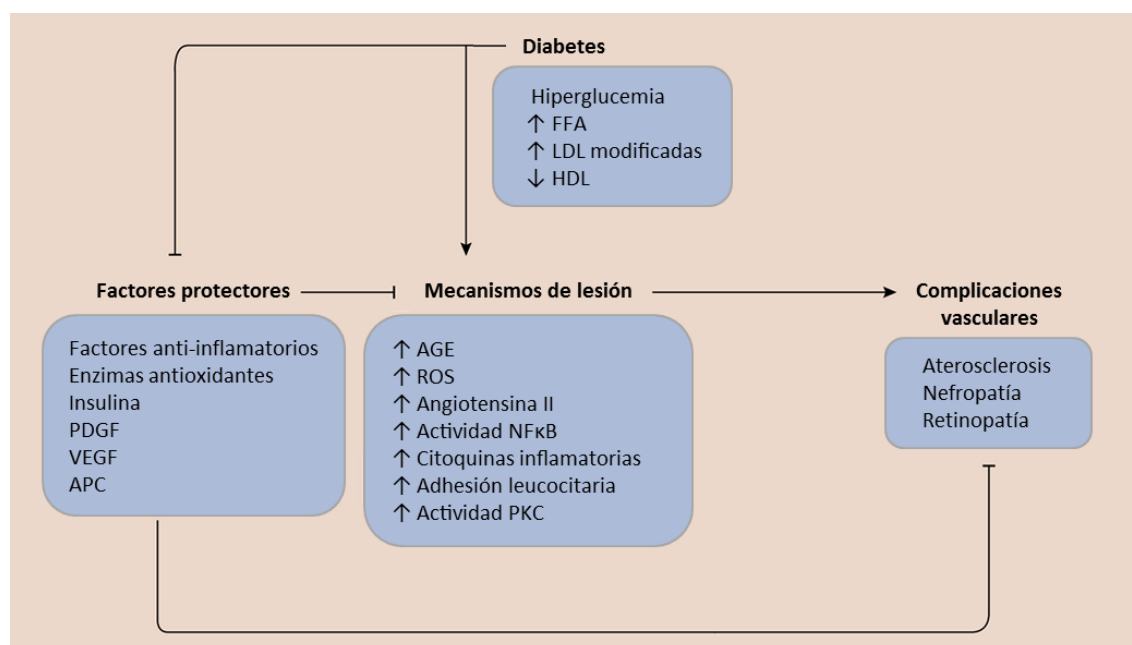


Figura 1.12 Esquema de los factores implicados en el desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes. En estado normal, los factores con funciones protectoras pueden reducir la susceptibilidad de los vasos sanguíneos de desarrollar enfermedad vascular y pueden contrarrestar los mecanismos que favorecen la lesión vascular. En la diabetes, la glucosa y los metabolitos lipídicos promueven los mecanismos de lesión y, al mismo tiempo, inhiben los factores protectores, favoreciendo el desarrollo de aterosclerosis, nefropatía y retinopatía. AGE: productos de glicación avanzada; APC: proteína C activada; FFA: ácidos grasos libres; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; NFκB: factor nuclear κB; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; PKC: proteína quinasa C; ROS: especies reactivas de oxígeno; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular. Figura adaptada de Rask-Madsen y King, 2013.

1.4 Señalización celular

1.4.1 La insulina y los factores de crecimiento similares a la insulina

La insulina es una hormona polipeptídica de 51 aminoácidos, descubierta en 1922 por Frederik G. Banting y colaboradores (Banting *et al.*, 1922). Es sintetizada por las células β de los islotes pancreáticos como una única cadena de 110 aminoácidos, la preproinsulina. Mediante su procesamiento por enzimas proteolíticas, la preproinsulina pierde el péptido señal del extremo amino-terminal dando lugar a la proinsulina. Posteriormente, la escisión de un fragmento interior de la proinsulina (péptido C) origina la insulina con dos cadenas (A y B), que quedan unidas por dos puentes disulfuro, y un tercer puente intracatenario en la cadena A (**Figura 1.13, A**) (Steiner *et al.*, 2009).

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF-I e IGF-II) son polipéptidos de una sola cadena con homología estructural a la proinsulina (**Figura 1.13, B**). Regulan procesos de proliferación y diferenciación en una multitud de tipos celulares y, además, son capaces de ejercer efectos metabólicos similares a los de la insulina (Cohick y Clemmons, 1993). Aunque los niveles circulantes de IGF-I e IGF-II están principalmente determinados por su producción hepática, la mayoría de las células del organismo sintetizan estos factores de crecimiento. La biodisponibilidad de los IGFs depende de su unión a las proteínas IGFBPs, de las que se han identificado seis diferentes en los humanos (Shimasaki y Ling, 1991). La IGFBP-3 es la encargada de transportar más del 90 % de los IGFs circulantes, formando un complejo ternario con una proteína adicional denominada subunidad ácido-lábil que limita el tránsito extravascular de los IGFs. A nivel celular, las IGFBPs forman un complejo binario con los IGFs que modula crucialmente sus acciones locales (Kelley *et al.*, 1996).

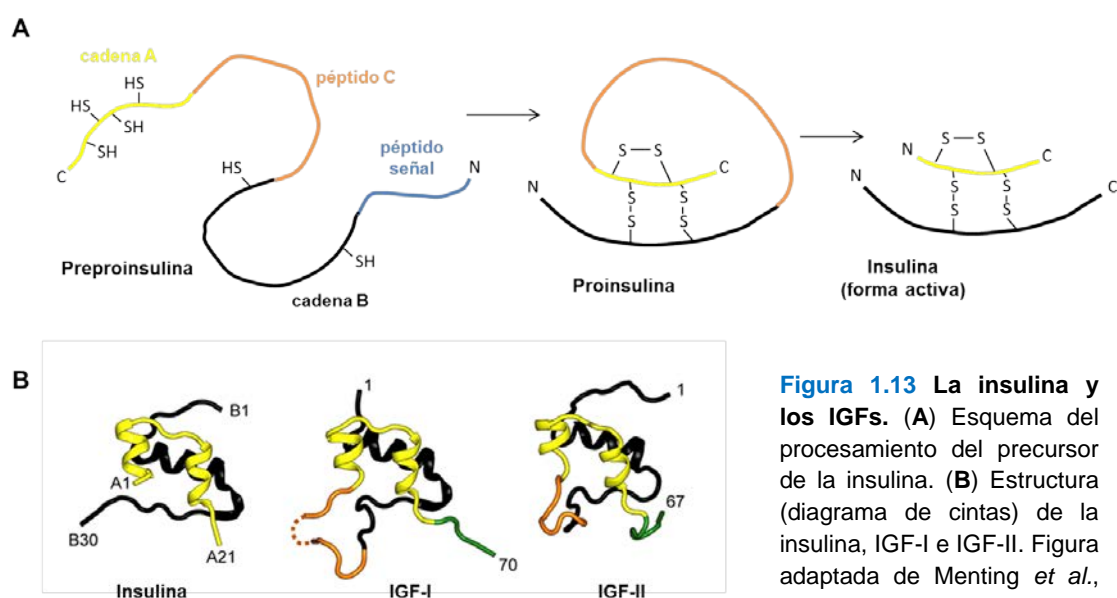


Figura 1.13 La insulina y los IGFs. (A) Esquema del procesamiento del precursor de la insulina. (B) Estructura (diagrama de cintas) de la insulina, IGF-I e IGF-II. Figura adaptada de Menting *et al.*, 2015.

1.4.2 El receptor de insulina y sus isoformas

El receptor de insulina (IR) es un heterotetrámero formado por dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembrana unidas por puentes disulfuro (Belfiore *et al.*, 2009). La cadena α y 194 residuos de la cadena β forman la porción extracelular, y una única cadena de 403 residuos de la cadena β constituye el dominio citoplasmático responsable de la actividad tirosina quinasa del receptor (**Figura 1.14, A**). De forma similar a la insulina, las dos cadenas del IR derivan de un mismo precursor, el pro-receptor que se ensambla tras una rotura proteolítica.

El IR humano está codificado por un gen de 22 exones que se localiza en el cromosoma 19. El procesamiento de corte y empalme (en inglés, *splicing*) alternativo del exón 11 en su transcrito primario da lugar a las dos isoformas del IR (Seino y Bell, 1989). Estas dos isoformas se diferencian en una secuencia de 12 aminoácidos del extremo C-terminal de la cadena α del IR, que está ausente en la isoforma A (IRA) y presente en la isoforma B (IRB) (**Figura 1.14, B**).

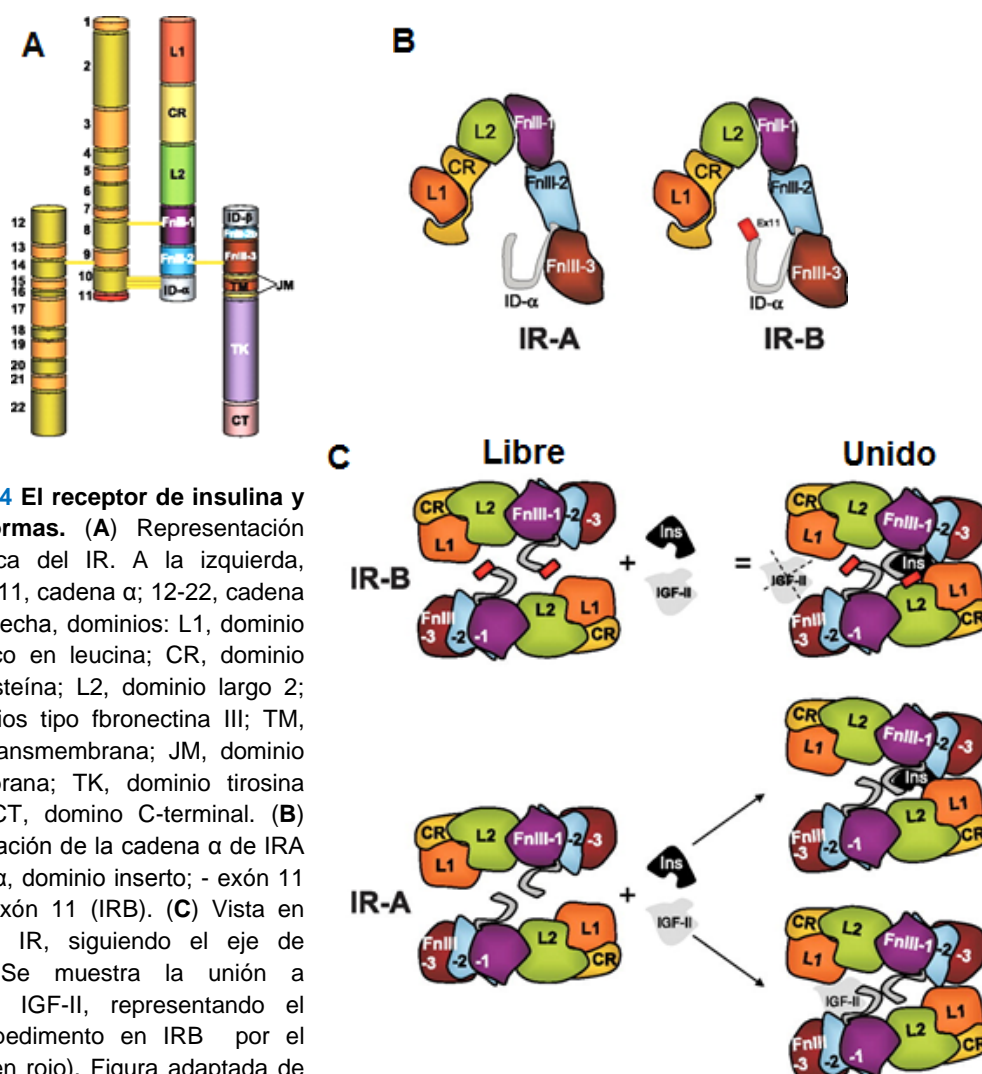


Figura 1.14 El receptor de insulina y sus isoformas. (A) Representación esquemática del IR. A la izquierda, exones: 1-11, cadena α ; 12-22, cadena β . A la derecha, dominios: L1, dominio largo 1 rico en leucina; CR, dominio rico en cisteína; L2, dominio largo 2; Fn, dominios tipo fibronectina III; TM, dominio transmembrana; JM, dominio juxtamembrana; TK, dominio tirosina quinasa; CT, dominio C-terminal. (B) Representación de la cadena α de IRA e IRB. ID- α , dominio inserto; - exón 11 (IRA), + exón 11 (IRB). (C) Vista en planta del IR, siguiendo el eje de simetría. Se muestra la unión a insulina e IGF-II, representando el mayor impedimento en IRB por el exón 11 (en rojo). Figura adaptada de Belfiore *et al.*, 2009.

Aunque el IR presenta una estructura común en todos los vertebrados, con hasta un 20 % de invariabilidad, el *splicing* alternativo del exón 11 es una característica exclusiva de mamíferos (Hernández-Sánchez *et al.*, 2008).

La expresión relativa de las dos isoformas varía de forma específica de tejido (Moller *et al.*, 1989). En la vida adulta, IRB se expresa predominantemente en los tejidos diana de la insulina, como hígado, músculo, tejido adiposo y riñón. En cambio, la expresión de IRA es mayoritaria en los tejidos fetales y tumorales (Denley *et al.*, 2003), aunque también puede encontrarse en la mayoría de los tejidos adultos. En la literatura encontramos discrepancias sobre la afinidad de las isoformas del IR por la insulina: diferentes trabajos indican una mayor afinidad de IRA por la insulina (Mosthaf *et al.*, 1990; Yamaguchi *et al.*, 1993), mientras que otros apuntan a una afinidad idéntica (Whittaker *et al.*, 2002). Las diferencias encontradas en la afinidad por la insulina son, en cualquier caso, muy modestas. Mucho más clara es la mayor afinidad de la isoforma IRA por el IGF-II (**Figura 1.14, C**), siendo mucho mayor que para el IGF-I (Frasca *et al.*, 1999). En esta alta afinidad por unirse a IRA y baja por IRB parecen ser importantes los dominios C y D de la molécula de IGF-II (Denley *et al.*, 2004).

1.4.3 Transducción de la señal

La unión de la insulina a la subunidad α del IR induce un cambio conformacional en la molécula del receptor que facilita la unión del ATP, la fosforilación de las subunidades β , el reclutamiento de sustratos intracelulares y su posterior fosforilación. En el estado libre de insulina, la conformación inhibitoria del IR mantiene una separación entre los dos dominios tirosina quinasa que impide que el *loop* de activación de una de las tirosina quinasas alcance al sitio catalítico de la otra tirosina quinasa (Kohanski, 1993). La unión de una sola molécula de insulina une los dos dominios extracelulares reduciendo el espacio de separación entre los dominios tirosina quinasa, lo que permite la transfosforilación de los *loops* de activación de los dominios tirosina quinasa.

La actividad tirosina quinasa del receptor fosforila numerosos sustratos intracelulares (Taniguchi *et al.*, 2006), de los cuales los mejor caracterizados son los sustratos del receptor de insulina (IRS). Los IRS son una familia de seis miembros con alta homología y diferente distribución tisular y función. IRS-1 e IRS-2 se encuentran ampliamente distribuidos, siendo IRS-2 fundamental en células β y hepatocitos, e IRS-1 en células endoteliales y de músculo liso vascular. Al fosforilarse en residuos de tirosina, los IRS sirven como puntos de anclaje para proteínas con dominios SH2 (*Srv homology 2 domain*). Muchas de estas proteínas actúan como moléculas adaptadoras, tal como la subunidad reguladora p85 de la PI3K o Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*). En esta compleja cascada de señales, las dos principales rutas clásicamente reconocidas median efectos metabólicos y mitogénicos mediante la activación de la PI3K o Ras, respectivamente (**Figura 1.15**).

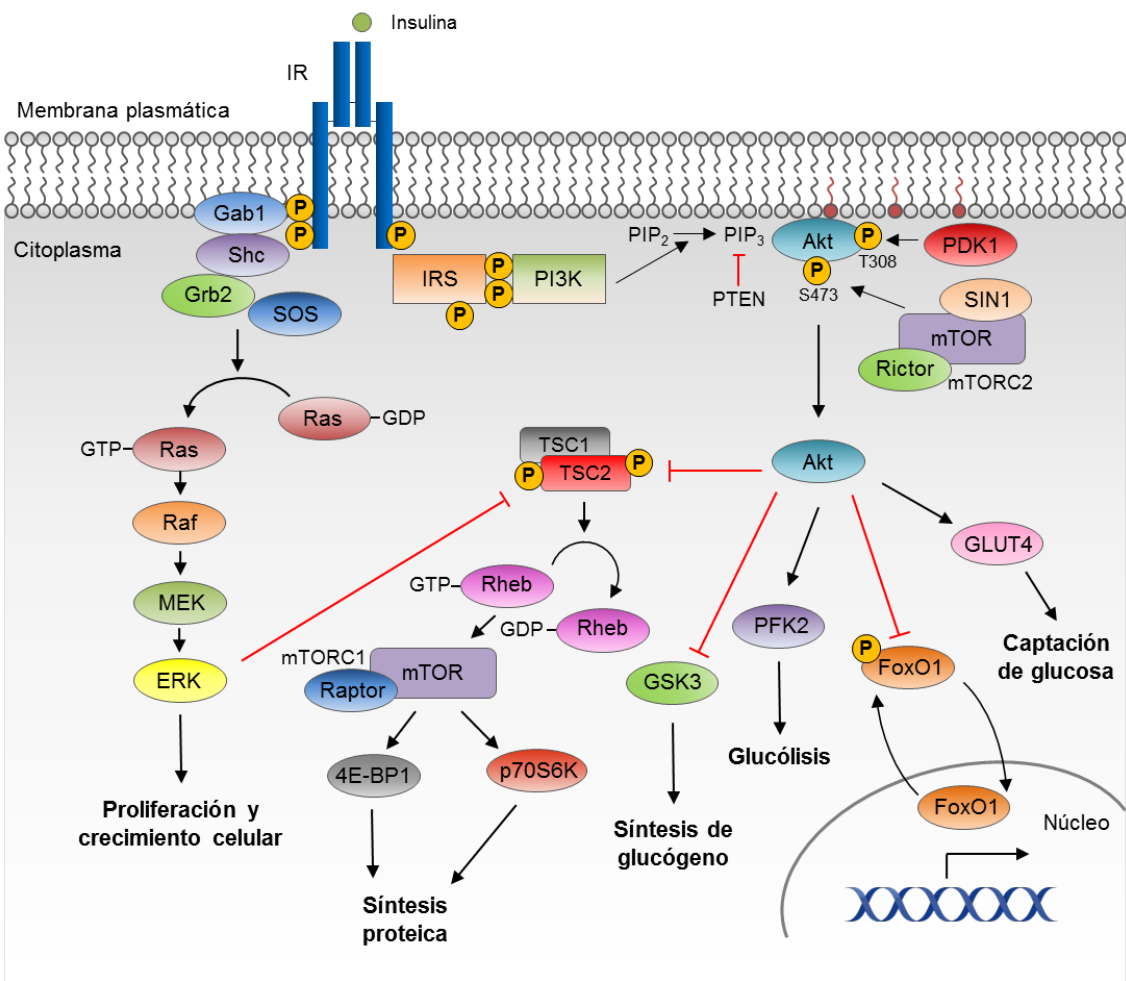


Figura 1.15 Esquema de la señalización de la insulina. Se muestran las rutas de señalización introducidas en esta sección.

1.4.3.1 Ruta PI3K/*Akt*

La PI3K funciona como un nodo crítico en la señalización de la insulina. Está formada por una subunidad reguladora y otra catalítica, las cuales presentan distintas isoformas. La interacción del dominio SH2 de la subunidad reguladora p85 con dominios de IRS fosforilados en tirosina produce la activación de la subunidad catalítica p110 (Myers *et al.*, 1992). Una vez activada, la PI3K cataliza la fosforilación del fosfolípido de membrana PIP₂ (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) para formar PIP₃ (fosfatidilinositol-4,5,6-trifosfato). PIP₃ actúa como segundo mensajero y permite el anclaje en la membrana plasmática y activación de proteínas con dominio PH (*pleckstrin homology*), como PDK1 (*phosphoinositide dependent protein kinase 1*). La activación de PDK1 conduce a la fosforilación de Akt en el residuo de treonina 308 y de PKCζ en la treonina 410. Para la completa activación de Akt es necesaria también la fosforilación de la serina 473, que no es mediada por PDK1 sino por mTORC2 (Sarbasov *et al.*, 2005). La activación de Akt regula enzimas metabólicas, como la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) y la fosfofructoquinasa-2 (PFK2), y está implicada en el metabolismo de la glucosa

mediante la inducción de la translocación del GLUT4 desde compartimentos intracelulares a la membrana plasmática (Taguchi y White, 2008). Akt activada también fosforila proteínas FoxO (FoxO1, FoxO3 y FoxO4), inhibiendo su acción al promover su exclusión nuclear y su degradación. Las proteínas FoxO actúan como factores de transcripción regulando diversas funciones celulares, entre las que se incluyen acciones metabólicas, estimulación de la apoptosis e inhibición del crecimiento celular (Myatt y Lam, 2007).

Otra vía regulada por la activación de PI3K-Akt es ruta de raptor-mTOR (mTORC1), que regula el metabolismo y crecimiento celular e integra señales procedentes de la insulina y factores de crecimiento con aquellas que provienen de los nutrientes (Taniguchi *et al.*, 2006). Akt fosforila e inactiva TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*), que se encuentra formando un complejo heterodimérico con TSC1 (*tuberous sclerosis complex 1*) y que funciona como activador de la GTPasa Rheb (*Ras-homolog enriched in brain*) (Taguchi y White, 2008). La inactivación de TSC2 por Akt reduce la actividad GAP (proteína activadora de GTPasa) del complejo TSC1/TSC2, incrementando así la cantidad de GTP unido a Rheb, lo que hace que se una y active el complejo mTORC1. Este complejo es el principal regulador de la síntesis proteica y la biogénesis ribosomal a través de la fosforilación de 4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*) y p70S6 quinasa (p70S6K). 4E-BP1 es una proteína que se encuentra unida al factor iniciador de la traducción eIF4E, reprimiendo la síntesis proteica. La activación de mTORC1 produce la fosforilación de 4E-BP1 en múltiples residuos, liberándose eIF4E, que se une al complejo de iniciación de la traducción y permite la síntesis de proteínas (Hara, 1997). p70S6K es una serina/treonina quinasa que fosforila directamente la proteína ribosomal S6 y activa, por fosforilación o interacción, múltiples proteínas de la maquinaria de traducción de mRNA, afectando colectivamente tanto a iniciación como a elongación de la traducción proteica (Ma y Blenis, 2009).

1.4.3.2 Ruta Ras-MAPK

La ruta Ras-MAPK es activada por la insulina tras la unión de Grb2 a los IRS fosforilados o a proteínas con dominio SH2 (Shc y Gab1). Grb2, a través de uno de sus dos dominios SH3, une y activa el factor intercambiador de nucleótidos de guanina SOS. Esto causa la activación del dominio GTPasa de Ras, y la subsiguiente activación de Raf, que desencadena una cascada de señalización que resulta en la fosforilación de MEK1/2 y ERK1/2 (Pouyssegur *et al.*, 2002).

En su forma inactiva, ERK1/2 se localiza principalmente en el citoplasma donde se encuentra formando un heterodímero con MEK1/2. Cuando ERK1/2 es fosforilado se disocia de MEK1/2 y se transloca al núcleo, donde fosforila una gran variedad de sustratos implicados en la activación de un complejo programa transcripcional. Además, ERK1/2 activo también fosforila numerosos sustratos en el compartimiento citoplasmático.

1.4.4 El receptor de IGF-I y los receptores híbridos IR/IGF-IR

El receptor de IGF-I (IGF-IR) pertenece, junto con el receptor de insulina, a la superfamilia de receptores tirosina quinasa de clase II. Ambos receptores presentan una elevada homología

estructural, que varía entre el 45-65 % en los dominios de unión al ligando y el 65-85 % en los dominios tirosina quinasa y de reclutamiento de sustratos (Ullrich *et al.*, 1986; Whittaker *et al.*, 2001). El IGF-IR se encuentra ampliamente expresado en la mayoría de tejidos y regula importantes procesos celulares como diferenciación, crecimiento celular y apoptosis (Arcaro, 2013). Tanto el IGF-I como el IGF-II interactúan con el IGF-IR, aunque el IGF-I se une con mucha mayor afinidad que el IGF-II. La unión del ligando a la cadena α extracelular del IGF-IR conduce a la autofosforilación de tres residuos de tirosina en el dominio tirosina quinasa de la cadena β (**Figura 1.16**), lo que activa vías de señalización similares a las descritas para el IR.

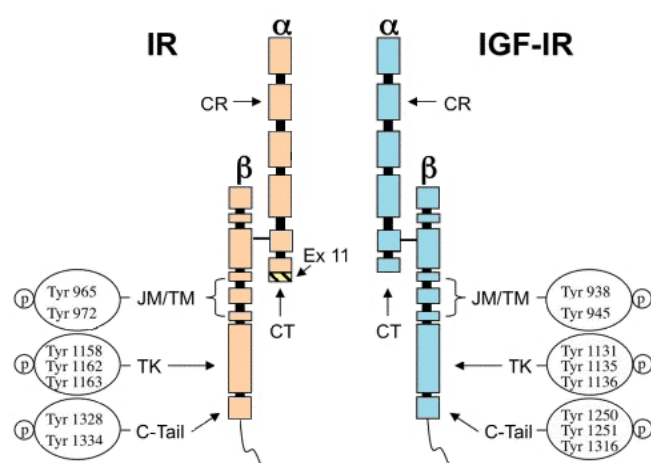


Figura 1.16 Estructura y sitios de autofosforilación del IR y del IGF-IR. Se muestran los principales dominios (CR, dominio rico en cisteína; CT, péptido C-terminal; TM, dominio transmembrana; JM, dominio juxtamembrana; TK, dominio tirosina quinasa; C-Tail, dominio C-terminal) y los residuos de tirosina susceptibles de fosforilación en el IR y el IGF-IR. Figura adaptada de Malaguarnera y Belfiore, 2011.

El IR y el IGF-IR se encuentran en la membrana plasmática como dímeros preformados compuestos por dos subunidades $\alpha\beta$ unidas por puentes disulfuro. La dimerización de las dos subunidades tiene lugar en el retículo endoplasmático, antes de la rotura proteolítica del pro-receptor que origina las cadenas α y β (Olson *et al.*, 1988). Una consecuencia del alto grado de homología entre los dos receptores es la formación de receptores híbridos compuestos por una subunidad $\alpha\beta$ del IR (IRA o IRB) y una subunidad $\alpha\beta$ del IGF-IR (**Figura 1.17**).

La existencia de receptores híbridos IR/IGF-IR fue propuesta por primera vez por Kasuga y colaboradores en 1983 (Kasuga *et al.*, 1983). Seis años más tarde, Soos y Siddle identificaron receptores híbridos procedentes de placenta humana (Soos y Siddle, 1989), confirmando así su existencia. Actualmente se sabe que los receptores híbridos están ampliamente distribuidos en la mayoría de tejidos y tipos celulares de los mamíferos (Baillyes *et al.*, 1997), incluidas células vasculares como las células endoteliales (Nitert *et al.*, 2005) y las VSMCs (Chisalita y Arnqvist 2005; Johansson y Arnqvist, 2006; Gómez-Hernández *et al.*, 2013). Se cree que la heterodimerización de los dos receptores ocurre con una eficiencia similar a la homodimerización, por lo que la proporción de receptores híbridos depende de la abundancia relativa de los receptores individuales (Baillyes *et al.*, 1997). Los tres ligandos (insulina, IGF-I e IGF-II) son capaces de unir y activar, además de sus propios receptores, los receptores híbridos IRA/IGF-IR e IRB/IGF-IR, aunque con diferente afinidad y eficacia (**Figura 1.17**).

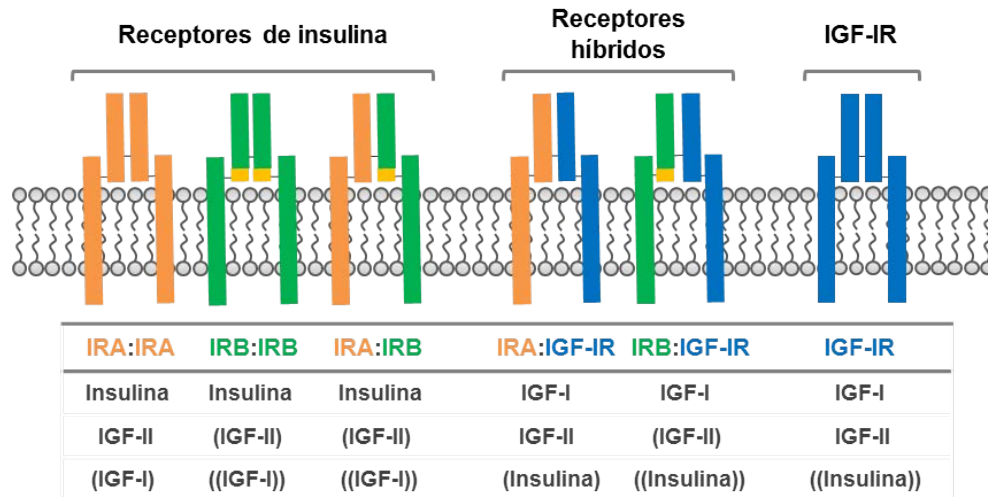


Figura 1.17 Familia de receptores de la insulina e IGFs. Cada receptor une distintos ligandos con diferente afinidad: los ligandos entre paréntesis tienen una afinidad de unión de 10-100 veces menor que el ligando de mayor afinidad; los paréntesis dobles indican una afinidad aún menor. Figura adaptada de Vigneri *et al.*, 2016.

1.4.5 El receptor de IGF-II

El receptor de IGF-II (IGF-IIR), homólogo al receptor de manosa-6-fosfato independiente de cationes, presenta una elevada afinidad por el IGF-II (Bergman *et al.*, 2013). Se trata de una glicoproteína transmembrana de tipo I compuesta por una larga región extracelular, una pequeña región transmembrana de 23 aminoácidos y una cola citoplasmática de 167 aminoácidos (**Figura 1.18**).

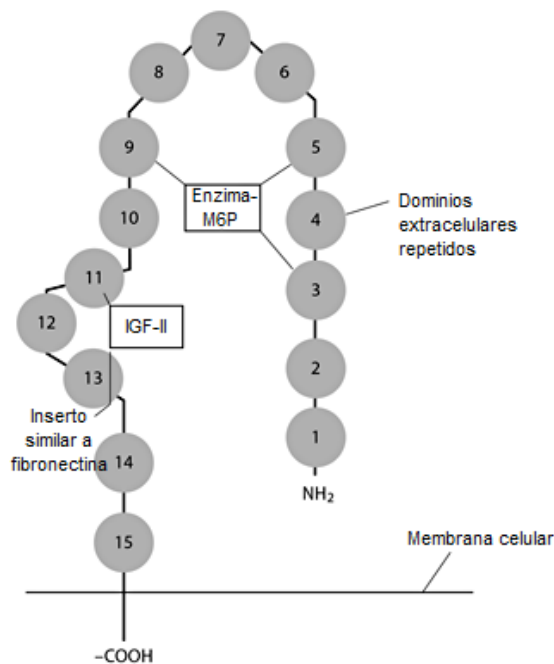


Figura 1.18 Esquema de la estructura del IGF-IIR. Cada número (1-15) representa un dominio extracelular repetido. El receptor se encuentra anclado a la membrana celular a través de un tramo hidrofóbico, con el extremo C-terminal en el espacio intracelular. Se muestran los sitios de unión para el IGF-II y proteínas con restos de manosa-6-fosfato. Figura adaptada de (Bergman *et al.*, 2013).

El IGF-IIR regula la cantidad de IGF-II circulante y tisular mediante su transporte al interior de la célula y degradación. Puesto que el IGF-II promueve el crecimiento celular, diferenciación y supervivencia, principalmente a través del IGF-IR y de la isoforma IRA, el IGF-IIR actúa como un inhibidor de crecimiento al disminuir la biodisponibilidad de IGF-II (Brown *et al.*, 2009). Sin embargo, se trata de un receptor multifuncional que, además de IGF-II, une enzimas lisosomales marcadas con manosa-6-fosfato, permitiendo la transferencia de enzimas lisosomales de nueva síntesis desde la red del trans Golgi hasta los endosomas tardíos. Asimismo, une otras proteínas que contienen restos de manosa-6-fosfato como la forma latente del TGF- β , la granzima B, el receptor del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPAR), el plasminógeno, el factor inhibidor de leucemia (LIF) glicosilado o el ácido retinoico. La activación del TGF- β es inhibida por la manosa-6-fosfato y se ha propuesto que dicha activación requiere la formación de un complejo entre el IGF-IIR, el plasminógeno, el uPAR y el TGF- β . Este modelo sugiere que la uroquinasa, unida al uPAR, transforma el plasminógeno en plasmina, la cual activa la forma latente del TGF- β . El TGF- β activo estimula la apoptosis celular a través de la activación de sus receptores. El IGF-IIR se ha considerado un receptor supresor de tumores (Hébert, 2006; Ou *et al.*, 2014), pues regula la captación intracelular de IGF-II, enzimas lisosomales, LIF glicosilado y granzima B (interviene en la apoptosis inducida por linfocitos T citotóxicos), así como la activación del TGF- β , todos ellos procesos que requieren un estricto control para evitar la carcinogénesis.

A pesar de ser considerado clásicamente como un receptor de aclaramiento de IGF-II, se ha descrito que el IGF-IIR puede desencadenar una señalización intracelular en respuesta al IGF-II que regula el comportamiento celular (Harris y Westwood, 2012). Así, el IGF-IIR, activado por el IGF-II, interacciona con la proteína G α_q e induce hipertrofia y apoptosis en cardiomioblastos y en células miocárdicas (Chu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2009), sugiriendo un papel del IGF-II y su receptor en la muerte celular cardíaca.

1.4.6 Papel de las isoformas del receptor de insulina en la enfermedad

El *splicing* del receptor de insulina es un mecanismo conservado en los mamíferos, responsable de la especificidad en la señalización de insulina e IGFs. Así, una expresión predominante de la isoforma IRA se asocia con una disminución de la señalización metabólica de la insulina y un incremento de la señalización de los IGFs, resultando de gran importancia en el desarrollo y crecimiento fetal. En cambio, una mayor expresión de la isoforma IRB se asocia con el predominio de las acciones metabólicas de la insulina durante la vida adulta. La desregulación de este mecanismo con el incremento de la IRA en la vida adulta puede jugar un importante papel en distintos procesos patológicos (Belfiore *et al.*, 2009).

En 1999, Frasca y colaboradores (Frasca *et al.*, 1999) y Sciacca y colaboradores (Sciacca *et al.*, 1999), pertenecientes al mismo laboratorio, demostraron por primera vez la expresión diferencial de las isoformas del IR en células tumorales en comparación con células normales. Se ha descrito, a partir de entonces, una expresión predominante de la isoforma IRA en una gran variedad de cánceres, entre los que se incluyen el cáncer de pulmón, colon (Frasca *et al.*,

1999), mama (Frasca *et al.*, 1999; Sciacca *et al.*, 1999), ovarios (Kalli *et al.*, 2002), tiroides (Vella *et al.*, 2002) y músculo (Sciacca *et al.*, 2002).

En la literatura existe controversia acerca de si un balance alterado de las isoformas del IR está implicado en la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2. Algunos estudios han descrito una disminución del ratio IRA/IRB en adipocitos y músculo esquelético de pacientes diabéticos (Mosthaf *et al.*, 1991; Sesti *et al.*, 1991; Kellerer *et al.*, 1993; Norgren *et al.*, 1993), mientras que otros no han encontrado diferencias (Benecke *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1993). Esto puede deberse a que la diabetes tipo 2 es un síndrome complejo y heterogéneo, de modo que el *splicing* del IR puede estar afectado por distintas variables como hiperinsulinemia, hiperglucemia, edad, estadio de la enfermedad y alteraciones genéticas. En cuanto al papel patológico de las isoformas del IR en las células β , la hiperglucemia crónica se ha relacionado con una disminución de la expresión de la isoforma IRA en favor de IRB en islotes pancreáticos humanos (Hribal *et al.*, 2003). Por último, en islotes pancreáticos extraídos de animales de 6 meses del modelo LIRKO inducible, los cuales presentan resistencia a la insulina e hiperplasia pancreática compensatoria, hay una mayor expresión de IRA (Escribano *et al.*, 2009).

Por otra parte, la sobreexpresión de la isoforma IRA podría contribuir al desarrollo de aterosclerosis al mediar las acciones proaterogénicas del IGF-II. Así, en un trabajo previo describimos un aumento significativo de la expresión de la isoforma IRA en los modelos ApoE^{-/-} y BATIRKO, que presentan daño vascular, y que, además, esta isoforma confería una ventaja proliferativa a las VSMCs (Gómez-Hernández *et al.*, 2013).

2. Objetivos

La obesidad es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y ocurre cuando la ingesta excede al gasto energético (Mathieu *et al.*, 2010). Se caracteriza por la acumulación excesiva o anormal de tejido adiposo, incluyendo los depósitos de grasa que rodean los vasos sanguíneos y que reciben el nombre de tejido adiposo perivascular (PVAT) (Ozen *et al.*, 2005). De forma similar al resto de tejidos adiposos, el PVAT es capaz de secretar numerosas sustancias biológicamente activas y ha sido implicado en la inflamación vascular (Brown *et al.*, 2014; Omar *et al.*, 2014).

Mediante estudios llevados a cabo en modelos animales carentes de BAT o UCP-1 se ha demostrado la capacidad de la función termogénica del BAT de proteger frente a la obesidad (Kontani *et al.*, 2005). Además, los individuos con menor cantidad de BAT son más propensos al aumento de su peso corporal, existiendo una relación inversa entre los niveles de BAT y el índice de masa corporal (Cypess *et al.*, 2009). En este contexto, el ratón *knock-out* para el receptor de insulina (IR) específicamente en el BAT (BATIRKO) es un modelo único de lipoatrofia marrón y diabetes debido a un defecto en la secreción de insulina, y que presenta resistencia vascular a la insulina y disfunción vascular (Gómez-Hernández *et al.*, 2012).

Por otro lado, es conocido que la aterosclerosis es la principal causa de las enfermedades cardiovasculares. La progresión de las lesiones vasculares desde la estría grasa hasta la formación de placas avanzadas es un proceso complejo (Libby *et al.*, 2011) en el que las células de músculo liso vascular juegan un papel relevante. La presencia de un gran número de VSMCs en la capa íntima pone de manifiesto la importancia de la migración y proliferación de estas células durante las etapas tempranas de la aterogénesis (Bennett *et al.*, 2016). En estadios más avanzados, en los que la inestabilidad de la placa aterosclerótica eleva el riesgo de que se desencadenen eventos cardiovasculares agudos, uno de los mecanismos que contribuye en gran medida al debilitamiento de la placa es la pérdida gradual de VSMCs como consecuencia de un aumento de su apoptosis.

El conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la aterosclerosis es crucial para identificar nuevas estrategias terapéuticas que frenen la progresión de la enfermedad, previniendo así la aparición de consecuencias clínicas. En este sentido, en un trabajo previo de nuestro grupo (Gómez-Hernández *et al.*, 2013) demostramos que la isoforma A del IR (IRA), y su asociación con el IGF-IR, confiere una ventaja proliferativa a las VSMCs en respuesta a distintos estímulos proaterogénicos. Sin embargo, el papel de las isoformas del IR y del IGF-IR en la migración o en la apoptosis de las VSMCs continuaba siendo desconocido.

Por todo ello, nos planteamos como **objetivo global** estudiar el papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos IR/IGF-IR en diferentes estadios de la aterosclerosis experimental y humana. En concreto, nos hemos centrado en la migración y la apoptosis de las VSMCs como procesos directamente implicados en la aterosclerosis temprana y avanzada, respectivamente. Para ello, se han utilizado muestras de pacientes con aterosclerosis temprana y avanzada, modelos experimentales de aterosclerosis con diferente grado de lesión y distintas líneas de VSMCs. Además, la generación de uno de los modelos experimentales nos ha permitido valorar el papel del tejido adiposo marrón en el proceso aterosclerótico.

Los objetivos específicos planteados en esta tesis fueron los siguientes:

Objetivo 1 Evaluar si la lipomatosis marrón severa agrava el proceso aterosclerótico experimental

Para llevar a cabo este primer objetivo se generó un nuevo modelo animal sin IR en el BAT y *knock-out* para la apolipoproteína E (BATIRKO; ApoE^{-/-}).

- 1.1. Estudiar las alteraciones vasculares y metabólicas asociadas a la adiposidad visceral producidas por una pérdida de la masa del tejido adiposo marrón.
- 1.2. Investigar la contribución de los distintos compartimentos del órgano adiposo (WAT visceral y subcutáneo, BAT y PVAT) en la expresión de marcadores inflamatorios vasculares.

Objetivo 2 El papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos en las fases iniciales del proceso aterosclerótico

Se utilizaron líneas de células de músculo liso vascular de aorta de ratón, un modelo experimental de aterosclerosis (ApoE^{-/-}) y muestras aórticas humanas.

- 2.1. Estudiar el papel de la insulina y los IGFs en la migración de las VSMCs, así como la contribución de las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos IR/IGF-IR a este proceso.
- 2.2. Estudiar la expresión de las isoformas del IR y el IGF-IR, así como la migración de las VSMCs en un modelo experimental de aterosclerosis.
- 2.3. Analizar la expresión de las isoformas del IR, el IGF-IR y los IGFs en la capa media de aortas humanas con lesiones ateroscleróticas iniciales.

Objetivo 3 El papel de las isoformas del IR, el IGF-IR, el IGF-IIR y los receptores híbridos en las fases avanzadas del proceso aterosclerótico

Se emplearon líneas de células de músculo liso vascular de aorta de ratón, distintos modelos experimentales (ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-}) y placas de pacientes con aterosclerosis carotídea.

- 3.1. Analizar la expresión de las isoformas del IR, el IGF-IR y el IGF-IIR en placas complicadas y no complicadas de pacientes con aterosclerosis carotídea.
- 3.2. Estudiar la expresión del IR, el IGF-IR y el IGF-IIR en modelos experimentales de aterosclerosis con distinto grado de lesión.
- 3.3. Investigar la contribución del IR, el IGF-IR y el IGF-IIR a la apoptosis de las VSMCs.

3. Materiales y métodos

3.1 Muestras humanas

3.1.1 Segmentos aórticos humanos

Se emplearon veintiocho segmentos aórticos infradiafragmáticos humanos, cada uno extraído de un donante diferente tras el trasplante de órganos, con la autorización de la Agencia de Biomedicina francesa. No existían diferencias significativas en cuanto a la edad y el sexo de los donantes. Del total de muestras aórticas obtenidas, 8 fueron clasificadas como sanas, por la ausencia de lesiones visibles macroscópicamente, y el resto mostraba características de lesiones ateromatosas tempranas (lesiones tipo II-IV, siguiendo la clasificación de Stary) (**Figura 3.1**), incluyendo 9 con lesiones de tipo estría grasa y 11 con lesiones fibrolipídicas. Para los estudios llevados a cabo en esta tesis se utilizó la capa media de dichos segmentos aórticos.

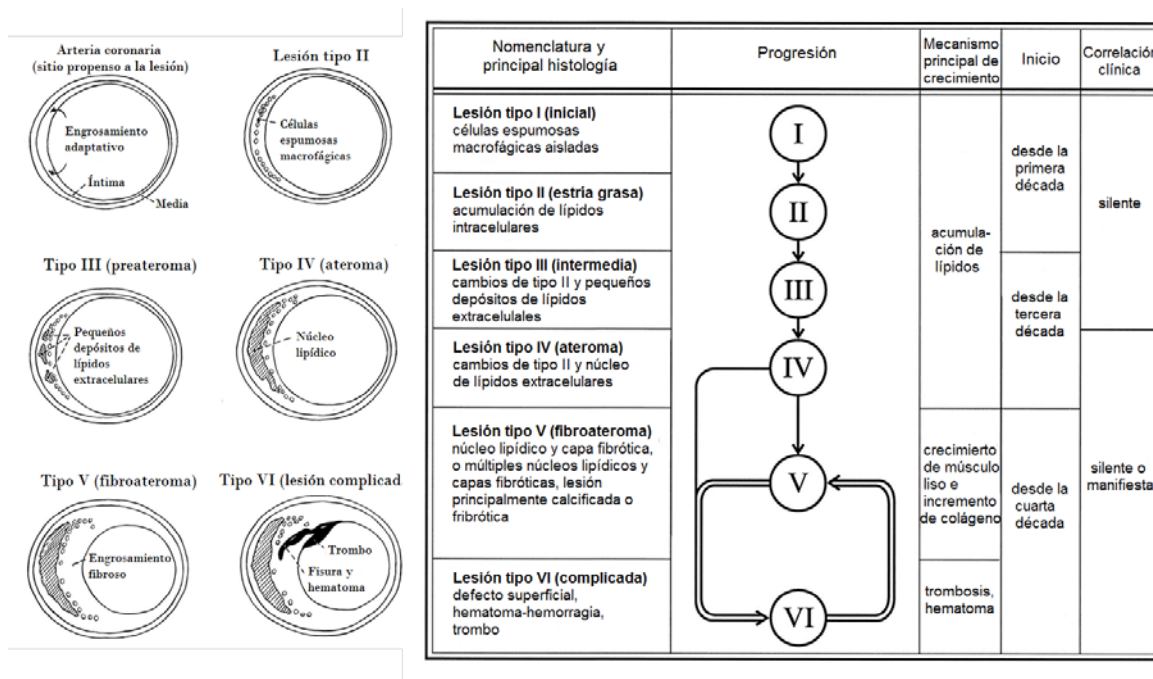


Figura 3.1 Esquema y clasificación histológica de las lesiones ateroscleróticas humanas según su evolución y progresión. Figura adaptada de Stary *et al.*, 1995.

3.1.2 Placas de pacientes con aterosclerosis carotídea

Cincuenta y nueve pacientes que iban a ser sometidos a una endarterectomía carotídea, por presentar una estenosis carotídea igual o superior al 70 %, participaron en el estudio con el consiguiente consentimiento informado antes de su inclusión. Del total de pacientes incluidos, 35 % eran diabéticos, 75 % hipertensos y 56 % presentaban algún tipo de dislipemia. El

estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Fundación Jiménez Díaz de acuerdo con las guías institucionales.

Las muestras recogidas durante la endarterectomía carotídea fueron diseccionadas separando la zona complicada estenosante de la placa adyacente no complicada. Las placas ateroscleróticas obtenidas fueron clasificadas en placas no complicadas (NCP) y placas complicadas (CP), correspondiendo estas últimas a lesiones tipo V-VI de la clasificación de Stary (**Figura 3.1**). Se estudiaron tres áreas diferentes de la placa: la capa media, la región fibrosa y la región de los hombros (área a ambos lados del núcleo lipídico).

3.1.3 Tinción tricrómica de Masson de placas ateroscleróticas humanas

Las placas ateroscleróticas procedentes de pacientes sometidos a una endarterectomía carotídea, previamente incluidas en parafina, fueron cortadas en secciones de 4 μm de grosor en un micrótopo. Las secciones se depositaron en la superficie de un baño de agua a 55 °C para su extensión completa sobre un portaobjetos. Para la clasificación histológica de las placas ateroscleróticas en NCP y CP se empleó la tinción de Masson, siguiendo las instrucciones del kit comercial. Esta técnica permite la tinción de las fibras colágenas y elásticas, observando diferentes coloraciones: tejido conjuntivo de verde, tejido muscular de verde pardo, eritrocitos de rojizo, núcleos de azul-negro y citoplasma y fibras musculares de rosa.

3.1.4 Inmunohistoquímica en placas ateroscleróticas humanas

Para su estudio inmunohistoquímico, las secciones procedentes de las placas ateroscleróticas humanas fueron desparafinadas, rehidratadas y sometidas a un tratamiento de desenmascaramiento antigénico con citrato, pH 6, en un equipo PT Link (Dako). Tras un lavado con PBS (*phosphate-buffered saline*), los cortes se introdujeron en una solución de H_2O_2 3 % y metanol (1:1) durante 30 minutos para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. A continuación, se lavaron de nuevo con PBS y se incubaron con una solución de bloqueo (4 % BSA y 6 % suero de la especie en la que fue generado el anticuerpo secundario, en PBS) en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante una hora, a fin de bloquear las uniones inespecíficas. Transcurrido este tiempo, se procedió a la incubación de los cortes con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente a temperatura ambiente durante una hora y, seguidamente, con el complejo avidina-biotina-peroxidasa Vectastin ABC kit (Vector Laboratories) durante 30 min. La relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados y sus diluciones se encuentra en el apartado 3.7.3.

Para la detección del anticuerpo se adicionó el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Dako) hasta observar en el microscopio la aparición de tinción, momento en el que se detuvo la reacción sumergiendo los cortes en agua. Por último, los cortes fueron contrastados con hematoxilina (Merck Millipore), se deshidrataron y se montaron con una resina acrílica con

base de xileno (DPX). Se realizaron controles negativos sin el anticuerpo primario para descartar la existencia de tinción inespecífica.

Se tomaron imágenes de los cortes teñidos mediante un microscopio Leica DMD108, las cuales se cuantificaron usando el programa Image-Pro Plus (ver apartado 3.6.1.2).

3.2 Experimentación animal

3.2.1 Trabajo con modelos animales

Para el desarrollo de esta tesis se emplearon distintos modelos animales. En la primera parte de la misma, se generó un nuevo modelo doble *knock-out* para el receptor de insulina específicamente en el tejido adiposo marrón y para la apolipoproteína E (modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}). Además de este nuevo modelo experimental se utilizaron los siguientes: ratones *wild type*, ratones con el exón 4 del IR flanqueado por secuencias LoxP (IR^{LoxP/LoxP}), ratones carentes del IR específicamente en el BAT (BATIRKO) y ratones *knock-out* para la apolipoproteína E (ApoE^{-/-}). Todos los modelos presentaban un *background* genético C57Bl/6.

Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de luz (ciclos luz/oscuridad de 12 horas), temperatura (23,3 °C) y humedad (65,1 %) durante todo el periodo experimental. Todas las manipulaciones con animales descritas en esta tesis se realizaron de acuerdo a las normas previstas por el Comité Ético de la Universidad Complutense de Madrid.

3.2.2 Generación de los modelos animales

3.2.2.1 Generación del modelo BATIRKO

El modelo BATIRKO se generó a partir de cruces sucesivos de los ratones transgénicos UCP-1-Cre^{+/-} e IR^{LoxP/LoxP}. De esta forma se obtuvieron ratones IR^{LoxP/LoxP}-UCP-1-Cre^{+/-} que presentaban una delección del receptor de insulina específica del tejido adiposo marrón (Guerra *et al.*, 2001).

Para la obtención de los ratones UCP-1-Cre^{+/-}, se construyó un plásmido formado por un vector y un inserto que incluía el cDNA de la recombinasa Cre, sus señales de localización celular y una porción del gen de la UCP-1 para asegurar la especificidad de tejido. Una vez obtenido el plásmido, se procedió a la microinyección pronuclear del DNA lineal dentro de los cigotos FVB/NJ procedentes del Jackson Laboratory.

Los ratones IR^{LoxP/LoxP} son ratones transgénicos derivados del linaje 129Sv, C57Bl/6 y FVB, que tienen el exón 4 del gen del IR flanqueado por secuencias LoxP, lo que permite utilizar el sistema de recombinación homóloga Cre/LoxP del bacteriófago P1. Mediante la expresión de la recombinasa Cre es posible inactivar el gen flanqueado por las secuencias LoxP.

3.2.2.2 Generación del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}

Para la generación del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}, hembras ApoE^{-/-} se cruzaron con machos IR^{LoxP/LoxP}-UCP-1-Cre^{+/-} (BATIRKO). Por sucesivos cruces de la progenie resultante, cuyo genotipo era IR^{LoxP/+}-UCP-1-Cre^{+/-}; ApoE^{+/-} o IR^{LoxP/+}-UCP-1-Cre^{-/-}; ApoE^{+/-}, se obtuvieron

ratones con genotipo $IR^{LoxP/LoxP}$ -UCP-1-Cre^{+/-}; ApoE^{-/-}, que carecían del IR en el BAT y de la ApoE.

3.2.2.3 Modelo ApoE^{-/-}

El modelo de ratón C57Bl/6 carente del gen que codifica para la apolipoproteína E (modelo ApoE^{-/-}) fue adquirido comercialmente (JAXTM ApoE Mice, Charles River Laboratories). Se trata de un modelo clásico de aterosclerosis que desarrolla hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, así como lesiones ateroscleróticas similares a las humanas, tanto de forma espontánea como al ser sometido a una dieta rica en grasa (Zhang *et al.*, 1992).

3.2.3 Caracterización genética de los modelos animales

La caracterización genética de los modelos animales se llevó a cabo a partir del DNA extraído de la cola de los ratones. Para la extracción del DNA se usó el kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega). Las colas se incubaron con 275 µL de una mezcla de digestión compuesta por: 200 µL de un tampón de lisis nuclear, EDTA (100 mM, pH 8,0), proteinasa K (20 mg/mL) y RNasa A (4 mg/mL), a 55 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se extrajo el DNA con 250 µL de tampón de lisis, y tras agitación intensa seguida de centrifugación (13000 rpm, 4 °C, 3 min), se recogió la fracción superior. El DNA fue precipitado mediante la adición de 600 µL de etanol absoluto y centrifugación (13000 rpm, 4 °C, 1 min), ciclo que se repitió 3 veces más. El precipitado se dejó secar durante 5 minutos y, a continuación, fue resuspendido en 300 µL de H₂O libre de nucleasas.

El genotipado de los animales fue realizado por PCR (ver apartado 3.4.4) con 1 µL de la solución anterior. Los *primers* y condiciones de PCR se encuentran recogidos en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1 *Primers* usados para el genotipado

Gen	Secuencia	Producto	Condiciones (T _m y ciclos)
<i>IR LoxP</i>	S: 5'-CTGAATAGCTGAGACCACAG-3' AS: 5'-GATGTGCACCCCATGTCTG-3'	WT: 270 pb LoxP: 300 pb	57 °C, 34 ciclos
<i>UCP-1-Cre</i>	UCP-1 S: 5'-GTCTGCACTGGCACTACCTA-3' UCP-1 AS: 5'-GGAGAAGCCTCATCAATGTCA-3' Cre AS: 5'-CCATCGCTCGACCAGTTTAGT-3'	600 pb	55 °C, 34 ciclos
<i>ApoE</i>	S: 5'-TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC-3' AS: 5'-TGTGACTTGGGAGCTCTGCAGC-3' AS: 5'-GCCGCCCGACTGCATCT-3'	WT: 155 pb KO: 245 pb	65 °C, 35 ciclos

3.2.4 Diseño de los modelos experimentales

3.2.4.1 Modelo BATIRKO; $ApoE^{-/-}$ de 24 semanas de edad sometido a dieta tipo *Western*

Para el desarrollo de este modelo experimental, se llevaron en paralelo cinco grupos de animales: Control STD, Control WD, BATIRKO WD, $ApoE^{-/-}$ WD y BATIRKO; $ApoE^{-/-}$ WD.

Los ratones Control STD fueron alimentados con una dieta estándar (3 % de grasa) desde la cuarta semana de vida hasta su sacrificio a las 24 semanas de edad. En el resto de grupos, los animales fueron alimentados con dieta estándar durante dos semanas y, a partir de las 6 semanas de edad, con una dieta occidental (dieta tipo *Western*), con un 21 % de kcal proporcionadas por la grasa, hasta el momento del sacrificio a las 24 semanas de edad (**Figura 3.2**).

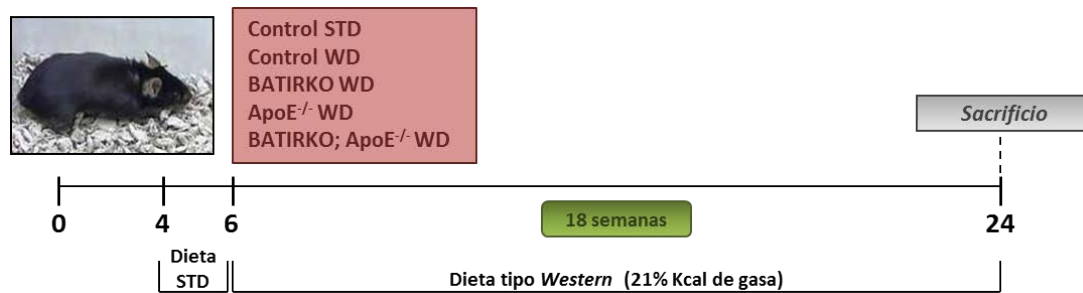


Figura 3.2 Diseño experimental del modelo BATIRKO; $ApoE^{-/-}$ de 24 semanas de edad sometido a dieta tipo *Western*. STD: dieta estándar; WD: dieta tipo *Western*.

3.2.4.2 Modelo $ApoE^{-/-}$ de diferentes semanas de edad sometido a dieta tipo *Western*

Los ratones $ApoE^{-/-}$, así como los ratones control de genotipo *wild type*, fueron alimentados con dieta estándar durante dos semanas y, a partir de las 6 semanas de edad, con dieta tipo *Western* (21 % de kcal proporcionadas por la grasa) durante 2, 6, 12 o 18 semanas. Se obtuvieron así cuatro grupos de ratones $ApoE^{-/-}$ de 8, 12, 18 y 24 semanas de edad y sus respectivos grupos controles de las mismas semanas (**Figura 3.3**).

3.2.4.3 Modelo BATIRKO; $ApoE^{-/-}$ de 15 meses de edad

Para el desarrollo de este modelo experimental se llevaron en paralelo tres grupos de ratones: Control STD, $ApoE^{-/-}$ STD y BATIRKO; $ApoE^{-/-}$ STD. Todos los animales fueron alimentados con una dieta estándar desde la cuarta semana de vida hasta su sacrificio los 15 meses de edad (**Figura 3.4**).

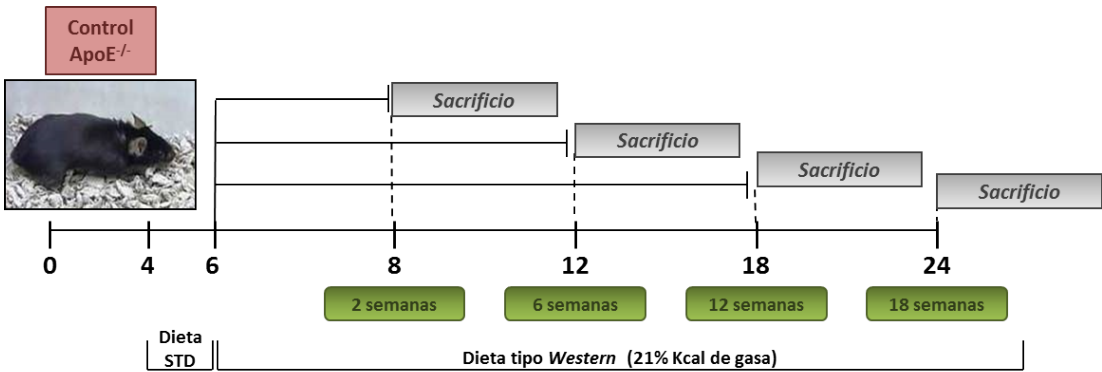


Figura 3.3 Diseño experimental del modelo ApoE^{-/-} de diferentes semanas de edad sometido a dieta tipo *Western*.

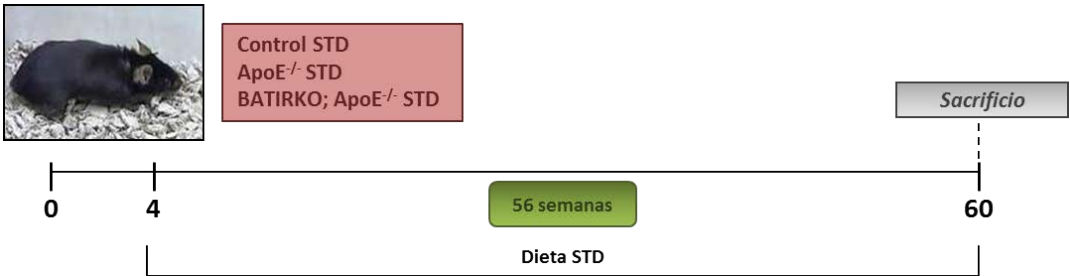


Figura 3.4 Diseño experimental del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-} de 15 meses de edad. STD: dieta estándar.

3.2.5 Técnicas empleadas en los modelos experimentales

3.2.5.1 Test de tolerancia a la glucosa

El test de tolerancia a la glucosa (GTT) se empleó para determinar la velocidad de aclaramiento de la glucosa plasmática. La prueba se realizó previo ayuno de los ratones durante toda la noche y se tomó una pequeña muestra de sangre para la medida de la glucemia basal mediante un glucómetro Accu-Chek® Aviva (Roche), antes de la inyección intraperitoneal de 2 g de glucosa por kg de peso corporal. Esta medida se consideró como tiempo cero y la glucemia se midió nuevamente a los 30, 60 y 120 minutos.

En los animales tolerantes a la glucosa, a partir de los 30 minutos la glucemia debe disminuir paulatinamente hasta alcanzar valores similares a los iniciales.

3.2.5.2 *Test de tolerancia a la insulina*

Para estudiar la tolerancia de los ratones a la acción de la insulina se llevó a cabo el test de tolerancia a la insulina (TTT). Esta prueba da una idea de la capacidad del organismo de responder a la administración de insulina, observando en los animales tolerantes una reducción de la concentración de glucosa en sangre que se va recuperando durante el transcurso de la misma.

La prueba se realizó en ratones no ayunados, es decir, la mediada de la glucemia inicial se tomó en situación postprandial. A continuación, se inyectó 1 U de insulina humana (Novo Nordisk) por kg de peso corporal y se tomó la medida de la glucemia a los 15, 30 y 60 minutos usando un glucómetro Accu-Chek® Aviva (Roche). Los resultados se expresaron como el porcentaje de la concentración inicial de glucosa en sangre.

3.2.5.3 *Test de secreción de insulina*

Para estudiar la respuesta del páncreas a la administración de glucosa se empleó el test de secreción de insulina. Los animales fueron ayunados durante toda la noche y, posteriormente, inyectados intraperitonealmente con 3 g de glucosa por kg de peso corporal. Se tomaron muestras de sangre de la cola a los 0, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos tras la inyección de glucosa que se consideró como tiempo cero. La concentración de insulina en el plasma se determinó mediante un kit de ELISA (Millipore).

3.2.5.4 *Señalización in vivo de insulina*

Los estudios de señalización *in vivo* de insulina permiten conocer la respuesta individual de cada tejido a la acción de la insulina. Los animales sin ayunar fueron inyectados por vía intraperitoneal con 1 U de insulina humana (Novo Nordisk) por kg de peso corporal. Tras 10 minutos, los ratones fueron anestesiados con 250 mg/kg de Avertina (tribromoetanol) y los tejidos extraídos e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido. Se estudió mediante *Western blot* la fosforilación de Akt (Ser473) en el BAT, WAT visceral (gonadal y retroperitoneal), WAT subcutáneo (inguinal), hígado, corazón, PVAT torácico y arteria aorta.

3.2.5.5 *Determinación del perfil metabólico y lipídico*

La concentración de insulina en el plasma de ratones previamente ayunados durante 24 horas se determinó mediante un kit de ELISA (Millipore).

Para estudiar el perfil lipídico de los modelos animales, se midió la concentración de colesterol total y de triglicéridos en el plasma de los ratones ayunados mediante kits comerciales (Spinreact), que se basan en métodos colorimétricos.

En el caso de la determinación del colesterol total, las reacciones que intervienen son las siguientes:

<u>Reacción</u>	<u>Enzima</u>
Ésteres de colesterol + H ₂ O → Colesterol + Ácidos Grasos	Colesterol esterasa
Colesterol + O ₂ → 4-Colestenona + H ₂ O ₂	Colesterol oxidasa
2 H ₂ O ₂ + Fenol + 4-Aminofenazona → Quinonimina + 4 H ₂ O	Peroxidasa

La quinonimina, que se forma como producto final, es un compuesto coloreado y la intensidad del color es proporcional a la concentración de colesterol total en la muestra. Esta intensidad de color se midió en un espectrofotómetro a 505 nm.

La determinación de la concentración de triglicéridos se basa en las reacciones:

<u>Reacción</u>	<u>Enzima</u>
Triglicéridos + H ₂ O → Glicerol + Ácidos Grasos Libres	Lipoprotein lipasa
Glicerol + ATP → Glicerol 3-fosfato + ADP	Glicerol quinasa
Glicerol 3-fosfato + O ₂ → Dihidroxiacetona fosfato + H ₂ O ₂	Glicerol 3-fosfato oxidasa
H ₂ O ₂ + 4-Aminofenazona + p-Clorofenol → Quinona + H ₂ O	Peroxidasa

La intensidad de color, originada por la formación de la quinona, es proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra y se midió en un espectrofotómetro a 505 nm.

3.2.5.6 *Resonancia magnética nuclear*

La determinación del contenido de grasa corporal total se realizó mediante imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN). Los animales fueron llevados al Centro de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico de la UCM donde fueron anestesiados y monitorizados su electrocardiograma y respiración durante la toma de imágenes por RMN. Se empleó un equipo Bruker BIOSPEC 47/40 (Bruker GmbH) que opera con un campo magnético de 4,7 Teslas (200 MHz) y un sistema de gradientes de alto rendimiento, con un gradiente máximo de 50 mT/m. Las imágenes obtenidas fueron cuantificadas usando el programa Image J (ver apartado 3.6.1.3) y los resultados expresados como el volumen de grasa corporal respecto al volumen corporal total.

3.2.5.7 *Tinción de hematoxilina y eosina*

Para su estudio histológico, los tejidos como el BAT, incluidos en parafina, fueron cortados en secciones de 7 µm de grosor en un micrótopo. Los cortes fueron desparafinados con citrosol (Panreac AppliChem) y rehidratados mediante su paso por una batería de etanoles de concentración decreciente 100, 96, 90, 70 % (v/v). Tras un lavado con ddH₂O, se tiñeron con

hematoxilina (tiñe los núcleos celulares) durante 15 minutos. Se lavaron de nuevo con ddH₂O y se introdujeron en eosina (tiñe el citoplasma celular) durante un minuto para, seguidamente, ser deshidratados y montados con un medio de montaje para sustitutos de xileno (Panreac AppliChem).

Los cortes teñidos fueron fotografiados usando un microscopio invertido Eclipse TE300 (Nikon) acoplado a una cámara Digital Sight DS-U2 (Nikon) y el tamaño de los adipocitos marrones se cuantificó usando el programa Image J.

3.2.5.8 Tinción de Oil Red O

Para determinar la acumulación lipídica en tejidos como el hígado o el arco aórtico, previamente incluidos en Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek) y congelados, se realizaron secciones de 7 µm de grosor en un criostato Leica CM1510 S y se depositaron sobre un portaobjetos. Los cortes fueron introducidos en una solución de formol al 10 % durante 2 minutos para fijar los tejidos. Tras un lavado en ddH₂O, los cortes se tiñeron con una solución del colorante Oil Red O (tiñe los lípidos neutros) 0,1 % (p/v) en isopropanol, filtrada y diluida en ddH₂O (3:2). Por último, y tras dos nuevos lavados en ddH₂O, los cortes fueron contrastados con hematoxilina (Panreac AppliChem) y montados con un medio de montaje con base de glicerol (Ibidi).

Los cortes teñidos fueron fotografiados usando un microscopio invertido Eclipse TE300 (Nikon) acoplado a una cámara Digital Sight DS-U2 (Nikon) y las imágenes se cuantificaron usando el programa Image J.

3.2.5.9 Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Los arcos aórticos procedentes de los modelos animales fueron incluidos en Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek) y congelados. Se realizaron secciones de 7 µm de grosor en un criostato Leica CM1510 S, que se guardaron en un congelador a -80 °C.

Los cortes, previamente atemperados, fueron introducidos en acetona durante 10 minutos y, posteriormente, en una solución de H₂O₂ 3 % y metanol (1:1) durante 30 minutos para inactivar la peroxidasa endógena. Tras un lavado con PBS, se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas mediante su incubación con una solución de bloqueo (4 % BSA y 8 % suero de la especie en la que fue generado el anticuerpo secundario, en PBS) en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, los cortes se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa o biotina (en el caso de la inmunohistoquímica) o fluoróforos (para la inmunofluorescencia), a temperatura ambiente durante una hora; y posteriormente, en el caso de los anticuerpos secundarios biotinilados, se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa Vectastin ABC kit (Vector Laboratories) durante 30 min. La relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados y sus diluciones se encuentra en el apartado

3.7.3 Se realizaron controles negativos sin el anticuerpo primario para descartar la existencia de tinción inespecífica.

Para la detección del anticuerpo mediante inmunohistoquímica, se adicionó el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Dako) hasta observar en el microscopio la aparición de tinción, momento en el que se detuvo la reacción sumergiendo los cortes en agua. Por último, los cortes fueron contrastados con hematoxilina (Panreac AppliChem) y se montaron con un medio de montaje con base de glicerol (Ibidi).

En el caso de la inmunofluorescencia, los cortes se incubaron con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) para la visualización de los núcleos celulares y se montaron con un medio de montaje con base de glicerol (Ibidi).

La adquisición de imágenes en contraste de fases y de inmunofluorescencia se realizó usando un microscopio invertido Eclipse TE300 (Nikon) acoplado a una cámara Digital Sight DS-U2 (Nikon) y las imágenes se cuantificaron usando el programa Image-Pro Plus (ver apartado 3.6.1.2).

3.3 Cultivos celulares

3.3.1 Generación de líneas celulares de músculo liso vascular

Se emplearon las siguientes líneas celulares de músculo liso vascular de aorta de ratón: WT e IRLoxP^{+/+} VSMCs (con IR), IR^{-/-} VSMCs (sin IR), IRA VSMCs (que expresan exclusivamente la isoforma IRA) e IRB VSMCs (que solo expresan la isoforma IRB), las cuales fueron generadas anteriormente en nuestro laboratorio (Gómez-Hernández *et al.*, 2013) como se describe a continuación.

3.3.1.1 Obtención de cultivo primario de células de músculo liso vascular de aorta de ratón

Para la obtención de los cultivos primarios de células de músculo liso vascular (VSMCs) se utilizaron ratones de genotipo *wild type* (WT) y LoxP/LoxP de 8 semanas de edad. Los ratones se anestesiaron con Avertina (triobromoetanol) y se perfundieron con solución salina. Se extrajo la arteria aorta torácica de cada animal con material quirúrgico estéril e inmediatamente las aortas fueron introducidas en un tubo con PBS estéril.

Dentro de la cabina de flujo laminar, se procedió a eliminar el tejido no perteneciente a la aorta, así como la capa adventicia de la misma. Una vez limpias, las aortas se dividieron en pequeñas secciones con la ayuda de un bisturí estéril y se incubaron en placas de 30 mm de diámetro con una mezcla de medio DMEM suplementado con de HEPES 20 mM y 4 mg de colagenasa II por mL de medio a 37 °C durante 45-60 minutos. Transcurrido este tiempo se recogió el medio con los trozos de aorta y se centrifugó a 900 rpm durante 4 minutos. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS). El ciclo de centrifugación y resuspensión del precipitado se repitió tres veces más y, finalmente, el último precipitado fue resuspendido en medio y se cultivó a 37 °C en una atmósfera controlada con alta humedad y 5 % de CO₂. Este precipitado estaba compuesto de células de músculo liso de la pared vascular y explantes de aorta. Cuando se observó crecimiento celular a partir de los explantes, estos fueron retirados.

3.3.1.2 Generación de líneas celulares estables

Cuando el cultivo primario de VSMCs alcanzó una confluencia del 70-80 %, se procedió a su immortalización mediante la infección con partículas virales codificando para el brazo largo del antígeno T (LTA_g) de SV40 (DeCaprio *et al.*, 1988), obtenidas mediante transfección de células empaquetadoras Phoenix con el plásmido pBABE-puro-LTA_g (forma K1 mutante, E107K) (Gjoerup *et al.*, 2000). Esta proteína proporciona a las células la capacidad de propagarse indefinidamente y la inhibición del crecimiento celular por contacto, ya que suprime las propiedades transcripcionales de p53, responsable de iniciar la muerte celular y la detención del ciclo celular cuando la célula resulta dañada.

La infección se realizó en presencia del polibreno (Sigma-Aldrich) a una concentración de 8 µg/mL para favorecer la entrada de las partículas virales al interior de la célula, durante 72 horas en medio DMEM sin suplementar. Transcurrido este tiempo, las células se dejaron crecer en medio de mantenimiento DMEM-10 % FBS y se trataron con 1 µg/mL de puomicina durante 3 semanas para seleccionar las células infectadas. De esta forma se obtuvieron las líneas celulares WT e IRLoxP^{+/+} VSMCs.

3.3.1.3 Delección *in vitro* del IR por expresión de la recombinasa Cre

La línea IRLoxP^{+/+} VSMCs generada contiene secuencias LoxP flanqueando el exón 4 del receptor de insulina. Mediante el sistema de recombinación Cre/LoxP es posible escindir del genoma la secuencia flanqueada por las secuencias LoxP (**Figura 3.5**). La recombinasa Cre es una proteína tetramérica procedente del bacteriófago P1. Reconoce las secuencias LoxP, por las que corta y une de forma circular la región entre ellas mediante recombinación, eliminando así dicha región del genoma. Al escindir el exón 4, en el mensajero queda un codón de parada que detiene la traducción del IR, perdiendo completamente su función.

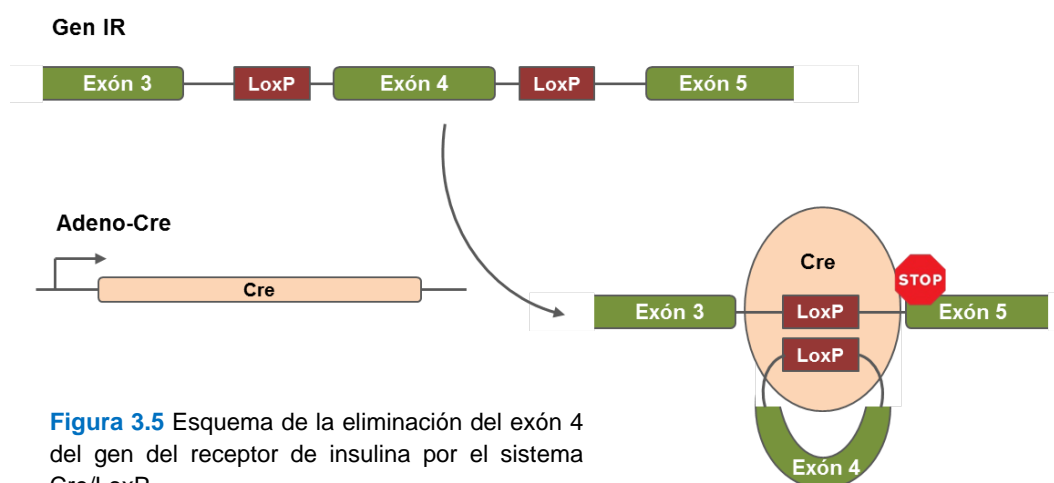


Figura 3.5 Esquema de la eliminación del exón 4 del gen del receptor de insulina por el sistema Cre/LoxP.

Las células IRLoxP^{+/+} VSMCs en subconfluencia se infectaron con adenovirus que codifican la recombinasa Cre. Tras una hora, el sobrenadante con los adenovirus fue reemplazado por medio de cultivo, y se aislaron colonias individuales, comprobándose la recombinación por PCR. Las células fueron subclonadas dos veces y se volvieron a infectar con adenovirus para asegurar que la escisión fuera completa. De esta manera quedó establecida la línea celular IR^{-/-} VSMCs.

3.3.1.4 Generación de líneas celulares mediante infección retroviral

Uno de los objetivos por los que resultaba de interés conseguir la línea IR^{-/-} VSMCs era el estudio diferencial de las dos isoformas del receptor de insulina (IRA e IRB), pues abrió la

posibilidad de reconstituir la expresión de una única isoforma. De esta forma se generaron dos nuevas líneas a partir de las IR^{-/-} VSMCs, que se denominaron IRA e IRB VSMCs.

A partir de dos construcciones que conferían resistencia a higromicina y que codificaban para una u otra isoforma del IR humano (secuencias proporcionadas por C.R. Kahn, Joslin Diabetes Center, Boston, EE.UU.), se obtuvieron partículas retrovirales. Las infecciones retrovirales se realizaron con aproximadamente 1 mL de sobrenadante viral enriquecido con polibreno 8 µg/mL (Sigma-Aldrich) por placa de 60 mm durante 1 hora, completando hasta 5 mL con medio completo sin antibióticos durante las siguientes 72 horas. Tras los 3 días de infección, se procedió a la selección con higromicina 0,2 mg/mL durante 3 semanas y, seguidamente, al subclonaje que fue realizado por el método de la dilución límite.

3.3.2 Condiciones de cultivo, mantenimiento y experimentación

3.3.2.1 Condiciones de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron suplementados con HEPES 20 mM (pH 7,4) y los siguientes antibióticos: penicilina G (12 µg/mL), estreptomycin (10 µg/mL), anfotericina B (0,25 µg/mL) y MycoZapTM Plus-CL (Lonza).

Las células fueron cultivadas en placas de poliestireno tratado para cultivo (Falcon) con DMEM glucosa 4,5 g/L (HyCloneTM) suplementado con 10 % de FBS, y mantenidas en una incubadora a 37 °C y una atmósfera controlada con alta humedad y 5 % de CO₂. Las células fueron subcultivadas tras su lavado con PBS (pH 7,4) e incubación con una solución de 0,05 % tripsina-EDTA (GibcoTM). La tripsina permite levantar a las células adheridas a la placa al digerir las proteínas que mantienen a las células unidas entre sí y a la placa; la digestión fue parada mediante la adición de medio completo con suero. El subcultivo se realizó una o dos veces a la semana dependiendo de la línea celular.

3.3.2.2 Congelación, criopreservación y descongelación de las líneas celulares

Para su congelación, las células fueron tripsinizadas y, una vez parada la reacción, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos para, a continuación, ser resuspendidas en FBS suplementado con 10 % (v/v) de dimetilsulfóxido e introducidas en criotubos debidamente etiquetados. Los criotubos se colocaron en un soporte de polietileno bañado por isopropanol (Mr. FrostyTM, Thermo Scientific) que fue introducido en un congelador a -80 °C, lo que permite un ritmo de congelación de -1 °C/min. Las células así congeladas pudieron mantenerse a -80 °C durante meses. Para periodos más largos los criotubos fueron colocados en un tanque de nitrógeno líquido (-196 °C).

La descongelación de las células se realizó de forma rápida, pasando directamente los viales de -80 °C o nitrógeno líquido a un baño a 37 °C, con agitación manual. Una vez descongeladas, las células fueron sembradas en placas de cultivo con medio completo.

3.3.2.3 Condiciones de experimentación

Las células fueron sembradas el día anterior al comienzo del experimento. Salvo excepciones indicadas, las células con una confluencia del 70-80 % se privaron de suero y glucosa 4-5 horas antes de la adición de los estímulos. Para ello, el medio de mantenimiento fue sustituido, tras el lavado de las células con PBS, por DMEM glucosa 1 g/L (HyClone™) sin suero.

3.3.3 Técnicas empleadas en los cultivos celulares

3.3.3.1 Ensayo de migración celular por cierre de herida

El estudio de la migración celular se llevó a cabo mediante el ensayo de cierre de herida. Las células fueron sembradas en placas de 60 mm con DMEM-10 % FBS y cultivadas hasta alcanzar la confluencia para, seguidamente, ser privadas de suero durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, se realizó una “herida” (incisión diagonal) con la ayuda de una punta de pipeta estéril. Las células se lavaron dos veces con PBS para eliminar aquellas células levantadas y/o muertas y se adicionó nuevamente medio sin suero. Se estimularon con insulina, IGF-I o IGF-II (10 nmol/L) y se mantuvieron en la incubadora a 37 °C y una atmósfera controlada con alta humedad y 5 % de CO₂ durante 24 horas. La migración celular fue observada mediante un microscopio invertido de contraste de fases Eclipse TE300 (Nikon) acoplado a una cámara Digital Sight DS-U2 (Nikon) a las 0, 6, 12 y 24 horas de realizar la herida. Se tomaron imágenes de tres puntos diferentes a lo largo de la herida a los diferentes tiempos de estudio. Las imágenes fueron analizadas usando el programa TScratch (ver apartado 3.6.1.4) y los resultados expresados como el porcentaje de cierre de herida a los diferentes tiempos respecto al tiempo cero.

3.3.3.2 Análisis de la actividad gelatinasa por zimografía

Para determinar la actividad de la MMP-2 (gelatinasa A) y la MMP-9 (gelatinasa B), las células fueron cultivadas hasta el 80 % de confluencia y privadas de suero durante 12 o 24 horas. El medio de cultivo de las diferentes condiciones experimentales fue recogido y usado para la preparación de muestras en condiciones no reductoras (añadiendo tampón de carga en ausencia de agentes reductores y sin calentamiento). Se prepararon geles de SDS-PAGE al 10 % de poliacrilamida en presencia de 0,1 % de gelatina (Sigma-Aldrich) y se cargaron con 30 µL de cada muestra. La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 80 V durante 2-3 horas. A continuación, el gel fue incubado con Tritón X-100 2,5 % (v/v) durante 30 minutos para la eliminación del SDS. Transcurrido este tiempo, el gel se lavó con un tampón de sustrato (NaCl 0,2 M, CaCl₂ 5 mM, Tritón X-100 1 %, NaN₃ 0,02 %, Tris 50 mM pH 7,5) y se incubó en este tampón a 37 °C durante toda la noche para permitir la renaturalización proteica y la activación de las MMPs. Al día siguiente, para observar las áreas de gelatina digerida (bandas claras), el gel se tiñó con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) durante una hora. La actividad MMP-2 y MMP-9 fue cuantificada usando el programa Image J.

3.4 Análisis de la expresión génica

3.4.1 Aislamiento de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo con una mezcla de tiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo siguiendo el método de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi, 1987). Las muestras aórticas humanas y los tejidos de los modelos animales fueron previamente pulverizados. Las muestras se homogenizaron en 1 mL de Trizol (Life Technologies) con el fin de conseguir la lisis celular y solubilización del RNA, y se pasaron a tubos Eppendorf, añadiendo a cada uno 200 μ L de cloroformo. Las muestras se agitaron con la ayuda de un agitador mecánico y se dejaron reposar en hielo durante 15 minutos para, seguidamente, ser centrifugadas a $12000 \times g$ durante 15 minutos a 4 °C, obteniendo dos fases. La fase superior acuosa, con el RNA solubilizado, se pasó a un nuevo tubo Eppendorf, quedando las proteínas y el DNA en la fase inferior orgánica. El volumen de fase acuosa separado se mezcló con un volumen igual de isopropanol, agitando por inversión, y las muestras se mantuvieron durante más de una hora a -20 °C para conseguir la precipitación de los ácidos nucleicos. Mediante una nueva centrifugación ($12000 \times g$, 15 minutos, 4 °C) se obtuvo un precipitado blanco. El sobrenadante fue eliminado por decantación y el precipitado lavado con 1 mL de etanol al 80 % (v/v), para volver a centrifugar y decantar el sobrenadante. Por último, el precipitado de RNA, una vez seco, fue resuspendido en 10-20 μ L de agua ultra pura.

3.4.2 Valoración de ácidos nucleicos

El contenido de ácidos nucleicos fue valorado mediante una lectura espectrofotométrica a dos longitudes de onda (260 y 280 nm) en cubeta de cuarzo. A la longitud de onda de 260 nm los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción, mientras que a 280 nm presentan un máximo los aminoácidos aromáticos de las proteínas. El ratio A_{260}/A_{280} da idea del grado de contaminación de las muestras con proteínas y en condiciones óptimas debe situarse entre 1,8 y 2. Para determinar la concentración de los ácidos nucleicos se considera que cada unidad de densidad óptica a 260 nm corresponde a 20 μ g/mL de oligonucleótidos, 40 μ g/mL de RNA de cadena sencilla y a 50 μ g/mL de DNA.

3.4.3 Síntesis de DNA complementario por PCR con tanscriptasa inversa (RT-PCR)

Para eliminar posibles contaminaciones con DNA, se incubaron 5 μ g de RNA con 10 U de DNasa I (Roche) y 20 U de inhibidor de RNasas, RNasin (Promega) en un tampón de incubación (Tris-HCl 40 mM, NaCl 10 mM, $MgCl_2$ 6 mM, $CaCl_2$ 1 mM, pH 7,9). Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y, posteriormente, la reacción se paró en una fase final de 5 minutos a 95 °C para inactivar la DNasa.

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA), la solución resultante de la reacción anterior fue sometida a transcripción inversa con un High-Capacity cDNA Reverse

Transcription Kit (Applied Biosystems), utilizando cebadores (en inglés, *primers*) aleatorios y la enzima transcriptasa inversa, según las instrucciones del fabricante. La solución se incubó dos horas a 37 °C y, transcurrido este tiempo, se inactivó la enzima por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos.

3.4.4 PCR y electroforesis en geles de agarosa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada a partir del DNA extraído de cola de ratón. Para la reacción se utilizó 1 µL de DNA en un volumen final de 25 µL compuesto por el tampón de reacción (Tris-HCl 75 mM, MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, (NH₄)₂SO₄ 20 mM, pH 9,0), *primers* 0,2 µM (cada uno), dNTPs 0,2 mM (cada uno) y 1 U de DNA polimerasa. Para la PCR se empleó un termociclador Veriti 96-well (Applied Biosystems) y las siguientes condiciones:

Paso	T ^a (°C)	T (min)	} 30-34 ciclos
1	94	3-10	
2	94	0,5	
3	T _m	0,5	
4	72	1	
5	72	2-10	
6	4	final	

Para el paso de hibridación se usó la T_m (temperatura de fusión o *melting*, en inglés) teórica de los *primers* -5°C (ajustada por la concentración de sales, usando Primer-BLAST).

El producto de la PCR se completó con un tampón de carga, concentración final [Tris-HCl, 1,7 mM, azul de bromofenol 0,005 % (p/v), xileno cianol 0,005 % (p/v), glicerol 10 % (v/v), EDTA 10 mM, pH 7,6], y fue resuelto mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5-3 % (p/v) en TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0), suplementado con GelRed (Biotium) tras la disolución de la agarosa. La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE. Como marcador de DNA se utilizó Phi-X174/HaeIII (Promega). El resultado fue visualizado mediante un transiluminador UV y las imágenes captadas con una cámara CCD (*charged coupled device*), ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad).

3.4.5 PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

El análisis de la expresión de los genes de interés se llevó a cabo mediante la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). El contenido de cDNA obtenido a partir del RNA de tejidos de los modelos animales se evaluó en un ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems), utilizando 20 ng de cDNA en TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) y la sonda TaqMan (Applied Biosystems) correspondiente al gen de interés. Las sondas comerciales (disponibles en la base de datos de Applied Biosystems) o diseñadas (sondas IRA) que fueron utilizadas en esta tesis se encuentran recogidas en la **Tabla 3.2**. Las sondas TaqMan se basan en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa para escindir una sonda marcada con un fluoróforo una vez hibridada a la secuencia diana, lo que permite la

emisión de fluorescencia de forma proporcional a la acumulación del producto durante los ciclos de PCR. Después de un paso inicial de 2 minutos a 50 °C y 10 minutos a 95 °C, las muestras se sometieron a 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

Tabla 3.2 Sondas TaqMan usadas en qRT-PCR

Gen	Código de la sonda	Gen	Código de la sonda
Ucp1	Mm00494069_m1	Serpine1 (PAI-1)	Mm00435860_m1
Prdm16	Mm00712556_m1	Igf1r	Mm00802831_m1
Fgf21	Mm00840165_g1	Lep (leptina)	Mm00434759_m1
Ppargc1a (Pgc1α)	Mm00447181_m1	Adipoq (adiponectina)	Mm01343606_m1
Tnf (TNF-α)	Mm99999068_m1	IRA (ratón)	
Nos3 (eNOS)	Mm00435204_m1	IRA (humana)	
End1 (ET-1)	Mm00438656_m1	Insr (IRB)	Mm00439693_m1
Icam1	Mm00516023_m1	Gapdh	Mm03302249_g1
Ccl2 (MCP-1)	Mm00441242_m1		

En el caso de las muestras aórticas humanas, se utilizó la mezcla SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara Biotechnology), según las instrucciones del fabricante, y los *primers* específicos están recogidos en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3 Primers usados en qRT-PCR

Gen	Primer sentido	Primer antisentido
Genes diana		
IR	5'-CGAGAAGACCATCGACTCGG-3'	5'-GACACCAGAGCGTAGGATCG-3'
IRB	5'-GAGGATTACCTGCACAACGTG-3'	5'-TAGGGTCCTCGGCACCAG-3'
IGF-IR	5'-ATGCGGTGTCCAATAACTAC-3'	5'-TTGTTGATGGTGGTCTTCTC-3'
IGF-I	5'-TTTCAACAAGCCCACAGGGT-3'	5'-TTGAGGGGTGCGCAATACAT-3'
IGF-II	5'-GTCATGGCAGACGCCACATT-3'	5'-CGAAGGCTCTGCCCTTCTTA-3'
Gen normalizador		
18S	5'-CCGTCGTAGTTCCGACCATAA	5'-CAGCTTTGCAACCATACTCCC-3'

Mediante esta técnica se obtuvo el valor Ct (del inglés, *cycle threshold*) para cada muestra. Las muestras fueron valoradas por duplicado, por lo que se tomó la media aritmética de los valores Ct. Seguidamente, los valores fueron normalizados mediante el cálculo del ΔCt , que viene dado por la diferencia entre el Ct del gen de interés y el Ct del gen endógeno normalizador [$\Delta Ct = Ct(\text{gen diana}) - Ct(\text{GAPDH o 18S})$]. A partir del valor ΔCt se calculó el $\Delta\Delta Ct$, que corresponde al ΔCt de cada muestra menos el ΔCt de la muestra control del experimento, y finalmente, se obtuvo el valor RQ ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$).

3.5 Análisis de la expresión de proteínas

3.5.1 Extracción de proteínas

3.5.1.1 Obtención de extractos proteicos

Los tejidos fueron pulverizados y homogenizados en 50-500 μ L de tampón de lisis [Tris-HCl 10 mM, Tritón X-100 1 % (v/v), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, NaCl 50 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 30 mM, NaF 50 mM, pH 7,6], al que se añadieron extemporáneamente fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, Na_3VO_4 1mM, leupeptina 10 μ g/mL y aprotinina 10 μ g/mL. Las células fueron lavadas dos veces con PBS frío, colocadas sobre hielo y raspadas con 50-200 μ L de tampón de lisis, según el formato de placa y densidad celular. El lisado se pasó a un tubo Eppendorf y, tras dejarse reposar en hielo 5-10 minutos, fue centrifugado (15 min, 12500 rpm, 4 °C). Se recogió el sobrenadante (extracto proteico total) y se descartaron los restos celulares del precipitado.

3.5.1.2 Valoración de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford, que se basa en la medida del cambio de absorbancia (de 465 nm a 595 nm) que se produce cuando se añaden proteínas a una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250. Las interacciones hidrofóbicas e iónicas producidas por aminoácidos básicos (principalmente arginina) estabilizan la forma aniónica del reactivo indicador, causando un cambio de color visible. Se preparó una curva de calibrado de 0-20 μ g/mL a partir de una solución estándar de BSA 2 mg/mL (Bio-Rad). Para el ensayo se midió en un espectrofotómetro la absorbancia a 595 nm de una mezcla de 1 μ L de la muestra a analizar en 1 mL de la solución de Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad) diluida en ddH₂O (1:5).

3.5.2 Western blot

3.5.2.1 Preparación de las muestras para la electroforesis

Las muestras fueron preparadas a la misma concentración de proteína, añadiendo el volumen correspondiente de extracto proteico, un tampón de carga [Tris-HCl 80 mM, glicerol 10 % (v/v), SDS 2 % (p/v), 2-mercaptoetanol 1 % (v/v), azul de bromofenol 0,004 % (p/v), pH 6,8] y completando con tampón de lisis hasta el volumen final. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos para conseguir la desnaturalización de las proteínas y se cargaron 30-50 μ g de cada muestra en geles de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*). Como marcador del peso molecular se usó PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

3.5.2.2 Electroforesis en geles de SDS-PAGE

La separación de las proteínas de los extractos proteicos se realizó por electroforesis en geles discontinuos de SDS-PAGE, según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), empleando un equipo de electroforesis Miniprotean II o TetraSystem (Bio-Rad).

Se prepararon geles con dos zonas de diferente concentración de poliacrilamida: 5 % para el gel superior concentrador y 6-15 % para el gel inferior separador, a partir de una solución al 30 % de acrilamida y bis-acrilamida en proporción 29:1 (Bio-Rad). El primero, que contiene los pocillos de depósito de muestras, sirve para concentrar y alinear las muestras; el segundo, para separar las proteínas según su peso molecular. La concentración de poliacrilamida final en el gel utilizada varió en función del peso molecular de las proteínas a analizar. Los geles contienen además de poliacrilamida, SDS que confiere a las proteínas una carga negativa uniforme, Tris-HCl pH 8,8 en el caso del gel separador o Tris-HCl pH 6,8 en el concentrador, y persulfato amónico y TEMED, que catalizan la polimerización del gel.

El desarrollo de la electroforesis se llevó a cabo en el siguiente tampón: Tris 25 mM, glicina 250 mM y SDS 0,1 % (p/v) pH 8,3, usando una fuente Powerpac HC de Bio-Rad, a un voltaje constante de 100 V para el gel concentrador y de 110-130 V para el gel separador durante 1,5-2 horas.

3.5.2.3 Transferencia a membranas de PVDF

Una vez finalizada la separación de proteínas, estas fueron transferidas de los geles de SDS-PAGE a membranas de PVDF (polifluoruro de vinilideno) Immobilon-P 0,45 μ m (Merck Millipore). Las membranas de PVDF, altamente hidrofóbicas, fueron previamente activadas por un breve paso por metanol y se dejaron en tampón de transferencia.

El gel se puso en contacto con la membrana de PVDF y ambos entre dos capas de papel Whatman, colocando todo el conjunto entre almohadillas y una carcasa, de tal forma que las proteínas migraran hacia el polo positivo. El tampón de transferencia usado fue: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20 % (v/v). La transferencia se desarrolló usando un Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), a un voltaje constante de 100 V y en frío durante una hora.

3.5.2.4 Bloqueo e incubación con anticuerpos

Finalizada la transferencia, los sitios de unión a proteínas inespecíficos en las membranas de PVDF fueron bloqueados. Para ello, las membranas se incubaron con una solución al 5% (p/v) de leche desnatada en polvo o al 3% (p/v) de BSA en TTBS [TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) más Tween-20 0,05 % (v/v)] a temperatura ambiente y en agitación suave durante una hora. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de bloqueo y las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario diluido en TTBS a 4 °C y en agitación suave hasta el día siguiente. La lista de anticuerpos primarios utilizados y sus diluciones se encuentra en la apartado 3.7.3.

Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 15 minutos de las membranas con TTBS en agitación fuerte y, seguidamente, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, diluido en TTBS a temperatura ambiente y en agitación suave durante una hora. El anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario al reconocer la fracción constante de la especie en la que fue generado. Finalmente, se realizaron otros 3 lavados con TTBS en agitación fuerte. Los anticuerpos secundarios utilizados están recogidos en la apartado 3.7.3.

3.5.2.5 Detección de anticuerpos por quimioluminiscencia

Para detectar los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), las membranas se incubaron con el reactivo de quimioluminiscencia Clarity™ Western ECL Substrate, que se basa en la oxidación del luminol, en presencia de H₂O₂ y un catalizador, a 3-aminofalato, que se encuentra en estado excitado y al volver a su estado fundamental emite luz visible (432 nm). Se empleó el sistema de detección ChemiDoc™ XRS+ System (Bio-Rad).

3.5.2.6 Borrado de membranas de PVDF

El borrado de las membranas se utilizó para eliminar los anticuerpos primario y secundario unidos a las mismas, permitiendo analizar diferentes proteínas cuyas bandas pudieran solaparse o una misma proteína en su forma fosforilada y total. Las membranas se incubaron con la solución de borrado comercial Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific) a temperatura ambiente y en agitación suave durante 5-15 minutos. Posteriormente, se lavaron varias veces con TTBS antes de ser incubadas con un nuevo anticuerpo primario.

3.5.3 Inmunoprecipitación

Para analizar la asociación de proteínas se empleó la técnica de inmunoprecipitación. A partir de los extractos proteicos se prepararon alícuotas con la misma cantidad de proteína para todas las muestras (150-500 µg) en un volumen final de 200 µL, ajustado con tampón de lisis, al que se añadió el anticuerpo correspondiente para inmunoprecipitar la proteína de interés (1-2 µg de anticuerpo por 1 mg de proteína), y se mantuvieron en rotación a 4 °C durante toda la noche.

Al día siguiente, se añadió una mezcla de proteína A o proteína G-agarosa (Roche), previamente lavada varias veces con tampón de lisis, con el tampón (1:1), dejándose en rotación a 4 °C durante 2-4 horas. La proteína A o G se une a las IgG por la fracción constante y, al estar conjugada con bolas de agarosa, estas sedimentan por centrifugación (9000 rpm, 4 min, 4 °C) junto con el inmunocomplejo anticuerpo-proteína de interés. El sobrenadante, con las proteínas no reconocidas por el anticuerpo, fue descartado y el precipitado se lavó varias veces con 500 µL del tampón de lisis, y finalmente, se añadió tampón de carga. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 min y se cargaron en geles de SDS-PAGE para su análisis por *Western blot*.

3.6 Otras técnicas

3.6.1 Cuantificación

3.6.1.1 *Blots*

Los *blots* fueron cuantificados usando la herramienta “*Analyze Gels*” del programa ImageJ. Fueron seleccionadas regiones rectangulares de mismo área para todos los puntos del *blot*, y se obtuvieron representaciones de la densidad de señal a lo largo de la región seleccionada. Se dibujó una línea base y se obtuvo el área bajo la curva, indicativa de la señal relativa de cada punto. Los resultados fueron normalizados con la señal de la proteína invariable usada como control (β -actina, α -tubulina, etc.).

3.6.1.2 *Imágenes de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia*

Las imágenes de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia fueron cuantificadas usando la herramienta “*Count and measure objects*” del programa Image-Pro Plus. Se seleccionó manualmente el color considerado como tinción positiva para una misma proteína y se obtuvo el valor correspondiente a la suma de todas las áreas teñidas del color seleccionado. Los resultados se expresaron como el porcentaje de área teñida respecto al área total analizada en cada muestra.

3.6.1.3 *Imágenes de resonancia magnética nuclear*

Las imágenes de RMN fueron cuantificadas usando la herramienta “*Analyze Particles*” del programa Image J, previo ajuste del valor umbral para todas las imágenes de un mismo animal. Se obtuvieron los valores del área de grasa y del área total del animal y, tras el cálculo matemático de los volúmenes correspondientes, los resultados se expresaron como el porcentaje del volumen de grasa respecto al volumen corporal total.

3.6.1.4 *Ensayo de cierre de herida*

Para el análisis de las imágenes de migración celular se empleó el programa Tscratch. Se obtuvo el valor porcentual del área de la “herida” (área sin células) para cada imagen tomada en el mismo punto de la herida a los diferentes tiempos de estudio. Se calculó porcentaje del área con células para cada tiempo referido al tiempo cero (a las 0 horas de realizar la herida) y este valor se consideró el porcentaje de cierre de herida.

3.6.2 Análisis estadístico

Todos los valores fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó usando el programa GraphPad Prism. Las diferencias entre dos grupos de valores se evaluaron mediante el test t de Student (prueba t despareada). Para la comparación entre múltiples grupos de valores se empleó el análisis de varianza o test ANOVA de una vía, seguido del test Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

3.7 Materiales

3.7.1 Reactivos

Los reactivos comunes de laboratorio fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales:

Merck Millipore: Triton X-100 y Tween-20.

Panreac AppliChem: ácido acético, etanol, glicerol, glicina, HCl, isopropanol, metanol y NaCl.

Roche: aprotinina, leupeptina y PMSF.

Santa Cruz Biotechnology: geneticina e higromicina.

Sigma-Aldrich: anfotericina B, ampicilina, DAPI, DMSO, EDTA, EGTA, estreptomycin, HEPES, kanamicina, 2-mercaptoetanol, NaF, paraformaldehído, penicilina G, puromicina, SDS y Tris base (Trizma).

3.7.2 Estímulos e inhibidores empleados en la experimentación con cultivos celulares

Los estímulos e inhibidores utilizados en los cultivos celulares fueron los siguientes:

Insulina (Sigma-Aldrich). Soluble: agua ultra pura, 1 mM. Concentración empleada: 10-100 nM.

IGF-I e IGF-II (Merck Millipore). Soluble: agua ultra pura, 0,1 mM. Concentración empleada: 10 nM.

Picrodopofilina (PPP) (Merck Millipore): cis-ciclolignano presente en la resina de podófilo (*Podophyllum peltatum*). Es permeable a la membrana celular y actúa como un sustrato competitivo, reversible, potente e inhibidor específico del IGF-IR. Mimetiza la estructura tridimensional de las tirosinas 1135 y 1136 del *loop* de activación dentro del dominio tirosina quinasa del IGF-IR e impide su fosforilación (**Figura 3.6**). Soluble: DMSO, 1 mM. Concentración empleada: 1-10 μ M.

Thapsigargina (Sigma-Aldrich): lactona sesquiterpénica extraída de la planta *Thapsia garganica*. Inhibe la Ca^{2+} /ATPasa del retículo endoplasmático, rompiendo su homeostasis de Ca^{2+} y generando estrés de retículo. Soluble: DMSO, 1 mM. Concentración empleada: 0,1-100 nM.

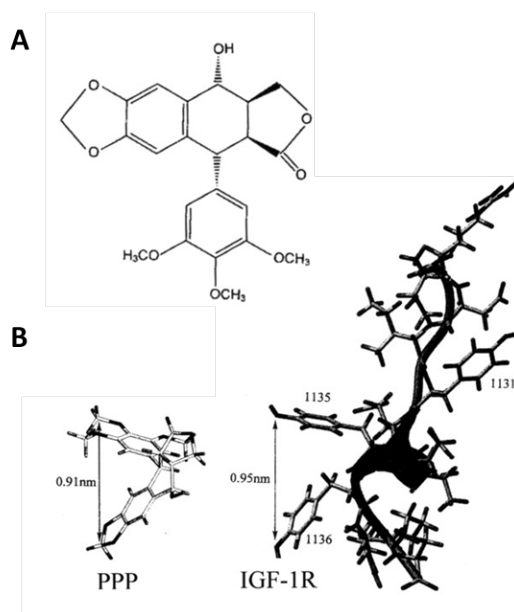


Figura 3.6 Picrodopofilina (PPP). (A) Estructura química del PPP. (B). Estructura tridimensional de la secuencia de aminoácidos 1127-1138 del IGF-1R (*loop* de activación del dominio tirosina quinasa) comparada con la estructura del PPP. Figura adaptada de Girnita *et al.*, 2004.

3.7.3 Listado de anticuerpos

Los anticuerpos primarios empleados para el desarrollo de esta tesis se encuentran recogidos en la **Tabla 3.4**.

Tabla 3.4 Anticuerpos primarios utilizados

Anticuerpo	Casa comercial (ref.)	Origen	Dilución	Uso
Akt	Cell signaling (#9272)	Conejo	1:1000	WB
AMPK α	Cell signaling (#2532)	Conejo	1:1000	WB
ATP-sintasa (ATP5H)	Abcam (ab11027)	Ratón	1:500	WB
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Cell signaling (#9661)	Conejo	1:1000	WB
Cleaved PARP (E51)	Abcam (ab32064)	Conejo	1:200	IHQ
CPTI-M (H-120)	Santa Cruz (sc-20670)	Conejo	1:1000	WB
F4/80	AbD Serotec (MCA497GA)	Rata	1:50	IHQ
HSL	Cell signaling (#4107)	Conejo	1:1000	WB
Hsp60	Enzo Life Sci (ADI-SPP-741)	Ratón	1:1000	WB
IGF-I (H-70)	Santa Cruz (sc-9013)	Conejo	1:100	IHQ
IGF-II (N-20)	Santa Cruz (sc-1415)	Cabra	1:200	IHQ
IGF-IIR (H-300)	Santa Cruz (sc-25462)	Conejo	1:1000, 1:50	WB, IHQ
IGF-IR β (C-20)	Santa Cruz (sc-713)	Conejo	1:1000, 1:200	WB, IP, IHQ, IF
IRB	Proporcionado por el Dr. Sesti y la Dra. Hribal.	Conejo		IP
IRS-1	Millipore (#06-248)	Conejo	1:500	WB

Tabla 3.4 Anticuerpos primarios utilizados

<i>Anticuerpo</i>	<i>Casa comercial (ref.)</i>	<i>Origen</i>	<i>Dilución</i>	<i>Uso</i>
IRβ (C-19)	Santa Cruz (sc-711)	Conejo	1:1000, 1:200	WB, IP, IHQ, IF
NOS-2 (N-20)	Santa Cruz (sc-651)	Conejo	1:50	IHQ
p-Akt (Ser308)	Cell signaling (#9275)	Conejo	1:1000	WB
p-Akt (Ser473)	Cell signaling (#9273)	Conejo	1:1000	WB
p-AMPKα (Thr172)	Cell signaling (#2531)	Conejo	1:1000	WB
p-IRS-1 (Ser307)	Cell signaling (#2381)	Conejo	1:1000	WB
Porina	Abcam (ab15895)	Conejo	1:1000	WB
p-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Cell signaling (#9101)	Conejo	1:1000	WB
p-p70 S6K (Thr389)	Cell signaling (#9205)	Conejo	1:1000	WB
p-Tyr (4G10® Platinum)	Millipore (#05-1050)	Ratón	1:1000	WB
UCP-1 (M-17)	Santa Cruz (sc-6529)	Cabra	1:500	WB
α-SMA	Sigma-Aldrich (A2547)	Ratón	1:5000	WB
α-SMA-Cy3™	Sigma-Aldrich (C6198)	Ratón	1:1000	IF
α-tubulina	Sigma-Aldrich (T6199)	Ratón	1:5000	WB
β-actina	Sigma-Aldrich (A5316)	Ratón	1:5000	WB

WB: *Western blot*; IP: inmunoprecipitación; IHQ: inmunohistoquímica; IF: inmunofluorescencia.

Los anticuerpos secundarios utilizados se encuentran recogidos en la **Tabla 3.5**.

Tabla 3.5 Anticuerpos secundarios utilizados

<i>Anticuerpo</i>	<i>Casa comercial (ref.)</i>	<i>Conjugado</i>	<i>Dilución</i>	<i>Uso</i>
Sheep anti-rabbit	GE Healthcare (NA931V)	HRP	1:5000, 1:200	WB, IHQ
Sheep anti-mouse	GE Healthcare (NA934V)	HRP	1:5000, 1:200	WB, IHQ
Donkey anti-goat	Santa Cruz (sc-2020)	HRP	1:5000	WB
Donkey anti-rabbit	Life Technologies (A21207)	Alexa Fluor 594	1:200	IF
Biotin-SP goat anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch (111-065-003)	Biotina	1:500	IHQ
Biotin-SP bovine anti-goat	Jackson ImmunoResearch (805-065-180)	Biotina	1:500	IHQ

HRP: peroxidasa de rábano; WB: *Western blot*; IHQ: inmunohistoquímica; IF: inmunofluorescencia.

4. Resultados

4.1 La lipoatrofia marrón severa agrava el proceso aterosclerótico experimental

La obesidad se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares (Mathieu *et al.*, 2010). Desde que se describiera en los últimos años la presencia de tejido adiposo marrón metabólicamente activo en individuos adultos y su relación inversa con el índice de masa corporal (Cypess *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2009), el estudio del BAT ha adquirido un gran interés como una posible diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad y sus complicaciones metabólicas y vasculares asociadas. En estudios previos de nuestro grupo, llevados a cabo en el modelo de ratón BATIRKO, se puso de manifiesto que la ausencia del receptor de insulina específicamente en el BAT conducía a una pérdida de la masa de este tejido (Guerra *et al.*, 2001), y que esta lipoatrofia marrón confería una mayor susceptibilidad a la obesidad, junto con la presencia de alteraciones vasculares como disfunción vascular y resistencia vascular a la insulina (Gómez-Hernández *et al.*, 2012).

Con el objetivo de comprobar si la lipoatrofia marrón severa observada en el ratón BATIRKO puede agravar el proceso aterosclerótico, generamos un nuevo modelo animal sin IR en el BAT y, además, carente de la apolipoproteína E (BATIRKO; ApoE^{-/-}). En primer lugar, comprobamos que la delección del IR tanto en el ratón BATIRKO como en el BATIRKO; ApoE^{-/-} era específica del BAT. Para ello, analizamos mediante *Western blot* la expresión del IR en el BAT y otros tejidos, como el hígado, el corazón o el músculo esquelético, de los cinco grupos de animales estudiados (**Figura 4.1**).

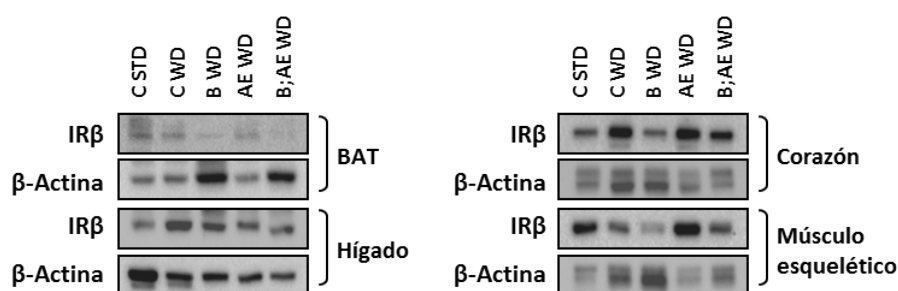


Figura 4.1 Expresión del IR en distintos tejidos del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. Análisis por *Western blot* del IR en el BAT, hígado, corazón y músculo esquelético de los cinco grupos de animales estudiados. AE: ApoE^{-/-}; B: BATIRKO; C: Control; STD: dieta estándar; WD: dieta tipo *Western*.

4.1.1 La lipoatrofia marrón severa induce adiposidad y alteraciones del metabolismo lipídico y de la glucosa

Para caracterizar el nuevo modelo estudiamos los principales parámetros metabólicos y lipídicos del ratón BATIRKO; ApoE^{-/-} y los comparamos con los del resto de grupos de animales (Tabla 4.1). Como cabía esperar, tanto el grupo BATIRKO como el BATIRKO; ApoE^{-/-} presentaban una disminución significativa de la masa de tejido adiposo marrón interescapular, expresada como el ratio entre la masa de BAT y el peso corporal (Tabla 4.1 y Figura 4.2, A), así como una reducción del tamaño de las gotas lipídicas y una marcada eosinofilia observadas en secciones de BAT teñidas con hematoxilina y eosina (Figura 4.2, B), en comparación con sus controles. Asimismo, medimos el tamaño de los adipocitos marrones encontrando una disminución significativa del mismo en el BAT de los ratones BATIRKO y BATIRKO; ApoE^{-/-} en relación a sus controles (Figura 4.2, C).

Tabla 4.1 Perfil metabólico y lipídico del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-} WD

	Control STD (n = 10)	Control WD (n = 10)	BATIRKO WD (n = 10)	ApoE ^{-/-} WD (n = 10)	BATIRKO; ApoE ^{-/-} WD (n = 10)
Parámetros en ayuno					
Peso corporal (g)	28,4 ± 0,3	30,6 ± 0,6	30,08 ± 0,8	29,7 ± 0,5	29,4 ± 0,6
BAT (mg)/Peso (g)	3,8 ± 0,1	2,9 ± 0,1	1,3 ± 0,2;*†#	3,3 ± 0,2	1,3 ± 0,1;*†#
tWAT (mg)/Peso (g)	21,8 ± 0,5	52 ± 1;*	46 ± 2;*	52 ± 4;*	48 ± 6;*
vWAT (mg)/Peso (g)	18,7 ± 1	32 ± 2;*	38 ± 2;*†#	26 ± 2	36 ± 3;*†#
gWAT (mg)/Peso (g)	10,4 ± 0,8	26 ± 1	30 ± 2;*†#	15 ± 2	28 ± 2;*†#
rpWAT (mg)/Peso (g)	5 ± 0,3	11 ± 0,5;*	9 ± 0,7;*	14 ± 0,2;*	11 ± 0,7;*
iWAT (mg)/Peso (g)	7,5 ± 0,6	12 ± 0,6;§	8,5 ± 0,6	14 ± 4	11 ± 3
Hígado (mg)/Peso (g)	37,2 ± 0,5	35 ± 0,9	43 ± 1	39 ± 2	39,1 ± 0,5
Insulina (ng/dL)	0,3 ± 0,03	0,4 ± 0,03	0,29 ± 0,02;†#	0,42 ± 0,03	0,2 ± 0,01;*†#
Glucosa (mg/dL)	93,4 ± 3	93 ± 5	104,5 ± 1,3	90,5 ± 3,1	94,3 ± 3,6
Colesterol (mg/dL)	128 ± 11	187 ± 13	178 ± 14	831 ± 71;*†§	842 ± 43;*†§
Triglicéridos (mg/dL)	35 ± 3,8	31,7 ± 2,1	35,9 ± 3,6	181,2 ± 13;*†§	234 ± 13;*†§#
Parámetros en alimentación					
Peso corporal (g)	28 ± 1	29,3 ± 0,9	30,5 ± 0,6	29,2 ± 0,8	30,6 ± 0,3
BAT (mg)/Peso (g)	4,6 ± 0,1	5,1 ± 0,5	1,1 ± 0,1;*†#	4,4 ± 0,3	0,8 ± 0,02;*†#
tWAT (mg)/Peso (g)	23 ± 0,5	37 ± 5;#	43 ± 3;#	26,2 ± 1;*	44 ± 2;#
vWAT (mg)/Peso (g)	20 ± 1	36 ± 1;#	35,6 ± 2;#	14,5 ± 1	32 ± 0,8;#
gWAT (mg)/Peso (g)	11 ± 0,8	27,8 ± 1;#	28 ± 3;#	11 ± 0,5	22 ± 0,7;#
rpWAT (mg)/Peso (g)	6 ± 0,3	8,4 ± 1,3	7,1 ± 0,7	3 ± 0,7	10 ± 0,4;*
iWAT (mg)/Peso (g)	8 ± 0,2	12,6 ± 3;*	7,9 ± 0,8	9,8 ± 0,2	9,8 ± 0,2
Hígado (mg)/Peso (g)	40,3 ± 0,4	61,3 ± 1,8;*	56,4 ± 0,6;*	59,7 ± 0,7;*	59,7 ± 0,7;*
% Grasa/Vt (ng/dL)	35 ± 2,1	36 ± 2	31,4 ± 1	33 ± 1	43,5 ± 3,6;§#
Glucosa (mg/dL)	141 ± 7	145 ± 5	150 ± 2,5	150 ± 3	164 ± 1,3;§

STD: dieta estándar; WD: dieta tipo *Western*; gWAT: WAT gonadal; rpWAT: WAT retroperitoneal; iWAT: WAT inguinal; tWAT: WAT total (tWAT= gWAT + rpWAT + iWAT); vWAT: WAT visceral (vWAT= gWAT + rpWAT). *p<0,05 vs. Control STD; †p<0,05 vs. Control WD; §p<0,05 vs. BATIRKO WD; #p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD.

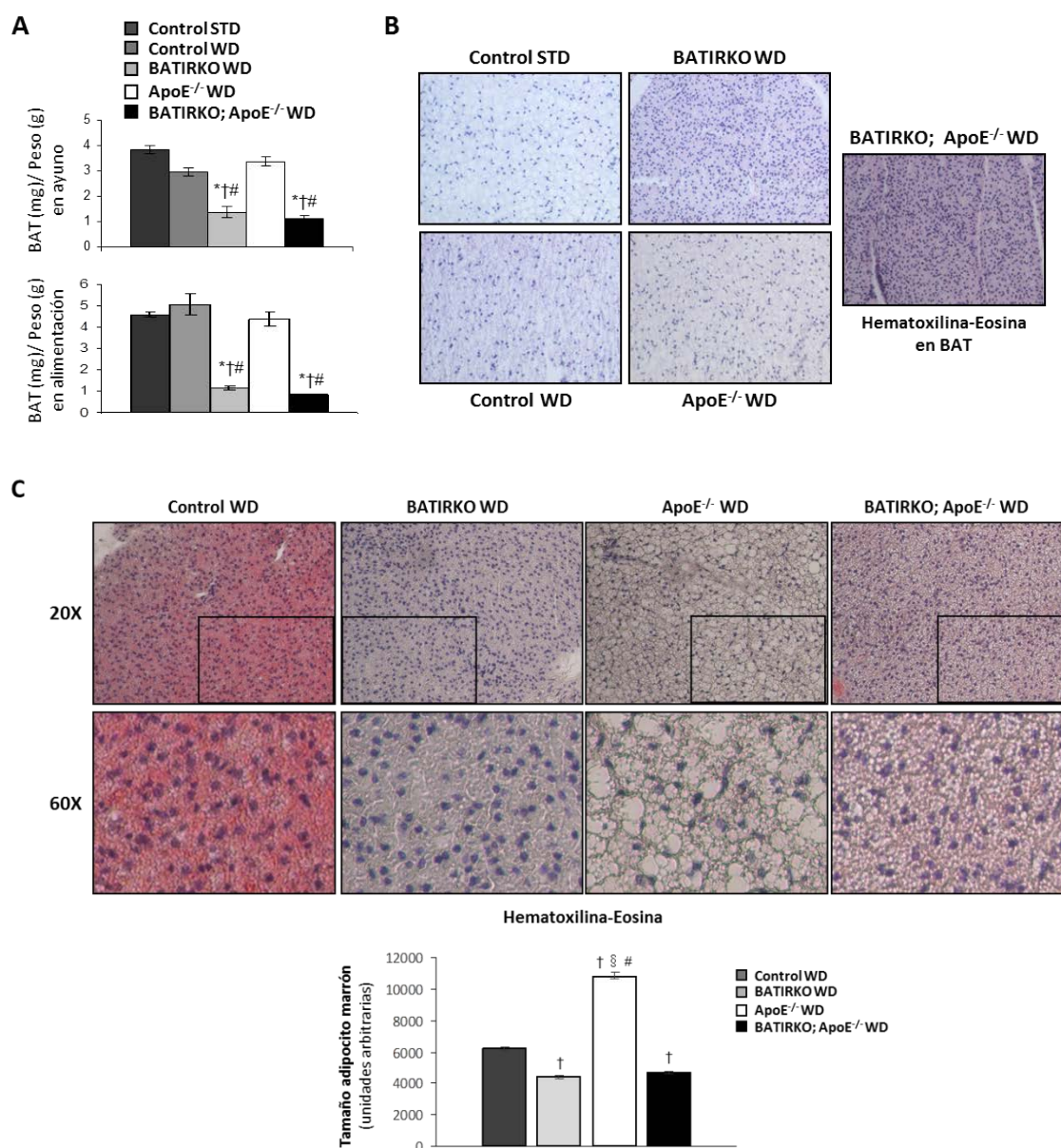
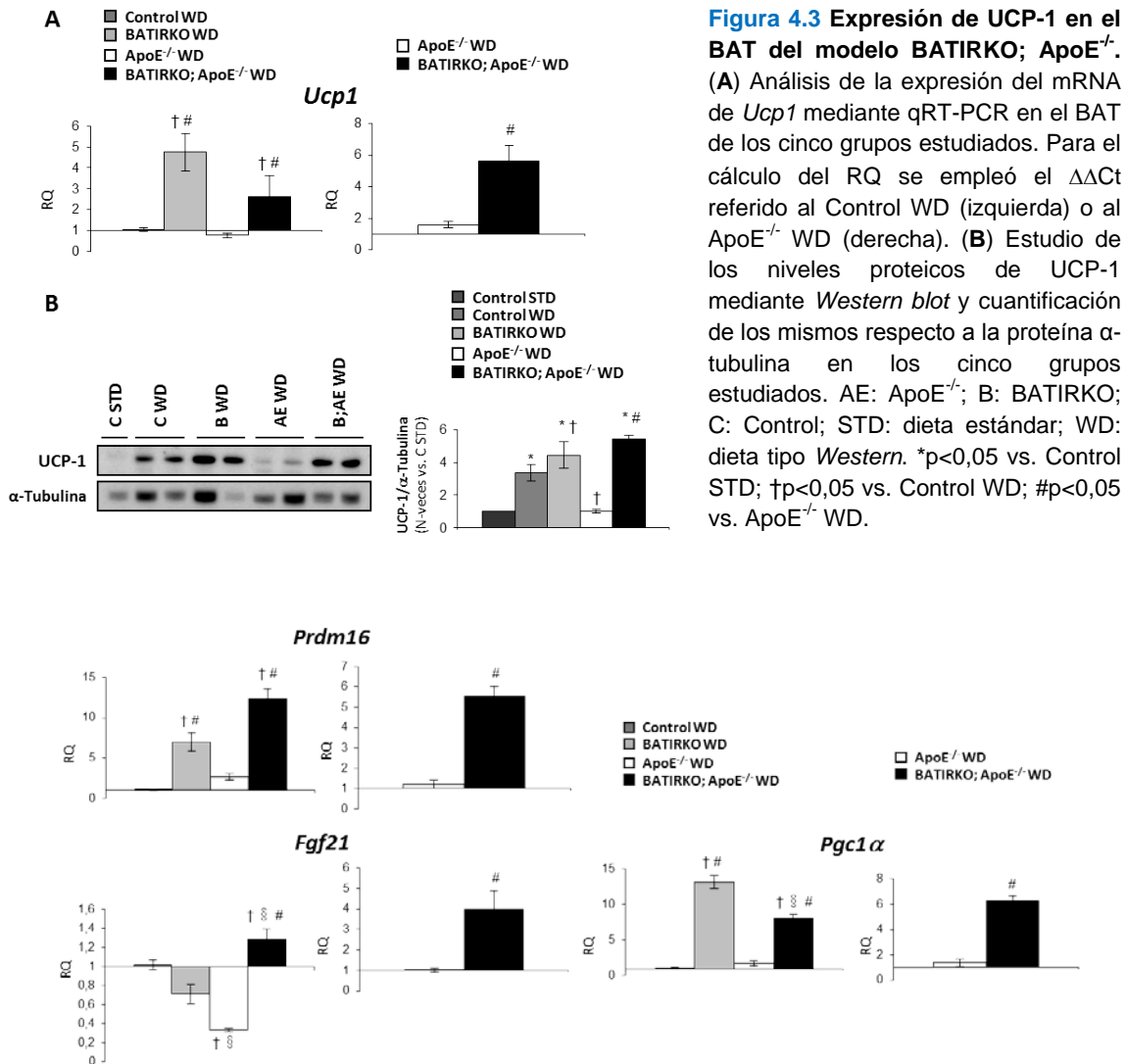


Figura 4.2 Contenido y estudio histológico del BAT del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. (A) Ratio BAT (mg)/Peso corporal (g) de los cinco grupos de animales en ayuno y en alimentación. (B) Fotomicrografías representativas de secciones de BAT teñidas con hematoxilina y eosina para comprobar la presencia de lipoatrofia marrón asociada al ratón BATIRKO. (C) Tinción con hematoxilina y eosina de secciones de BAT y cuantificación del tamaño de los adipocitos marrones mediante el programa Image J. STD: dieta estándar; WD: dieta tipo *Western*. *p<0,05 vs. Control STD; †p<0,05 vs. Control WD; ‡p<0,05 vs. BATIRKO WD; §p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD; #p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD.

Cuando se generó el modelo BATIRKO se describió que, a pesar de la pérdida de masa de BAT, el nivel de expresión de la principal proteína termogénica, UCP-1, era normal a los 3 meses de edad, e incluso aparecía incrementado en animales de 6 y 12 meses de edad (Guerra *et al.*, 2001). De forma similar, observamos que los niveles del mRNA (**Figura 4.3, A**), así como proteicos (**Figura 4.3, B**), de UCP-1 estaban incrementados en el BAT de los ratones

BATIRKO y BATIRKO; ApoE^{-/-} cuando los comparamos con el resto de grupos estudiados. Este hecho podría deberse a un mecanismo que trataría de compensar la lipoatrofia marrón severa que presentan estos dos modelos animales. Además de UCP-1, la expresión génica de otros marcadores termogénicos, como son PRDM16, FGF21 y PGC-1 α , también se encontraba incrementada en el BAT del grupo BATIRKO; ApoE^{-/-} (Figura 4.4), lo que se debería igualmente a un mecanismo compensatorio para tratar de mantener la integridad funcional del tejido adiposo marrón.



Continuando con el estudio de la funcionalidad del BAT, analizamos el contenido mitocondrial de este tejido en los distintos grupos de animales. Para ello, medimos la expresión de tres marcadores de contenido mitocondrial, la proteína de shock térmico 60 (Hsp60), la porina y la ATP sintasa, en los extractos proteicos totales procedentes del BAT. Los niveles de estas proteínas resultaron ser muy similares en los cinco grupos de animales estudiados (**Figura 4.5**). La función termogénica del BAT depende de la utilización de los lípidos procedentes de la lipólisis, la accesibilidad de los ácidos grasos a la mitocondria y de la maquinaria responsable de la β -oxidación y la cadena respiratoria. Por esta razón, quisimos investigar la expresión en el BAT de proteínas implicadas en el metabolismo lipídico y en la β -oxidación de los ácidos grasos. Así, encontramos un aumento significativo de los niveles de la carnitina palmitoiltransferasa I (CPTI-M), enzima que media el transporte de los ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial, en todos los grupos alimentados con dieta tipo *Western* en comparación con el grupo Control alimentado con dieta estándar (**Figura 4.6, A**). Sin embargo, la expresión de la lipasa sensible a hormonas (HSL) solamente se vio incrementada en el BAT de los ratones BATIRKO (**Figura 4.6, A**). Otra proteína que participa en la regulación del metabolismo lipídico es la AMPK, cuya activación mediante la fosforilación del residuo de treonina 172 favorece la β -oxidación de los ácidos grasos. Tanto la AMPK total como su forma activa (p-AMPK) se encontraban significativamente incrementadas en el BAT de los cuatro grupos de animales alimentados con dieta rica en grasa respecto al grupo control con dieta estándar (**Figura 4.6, B**).

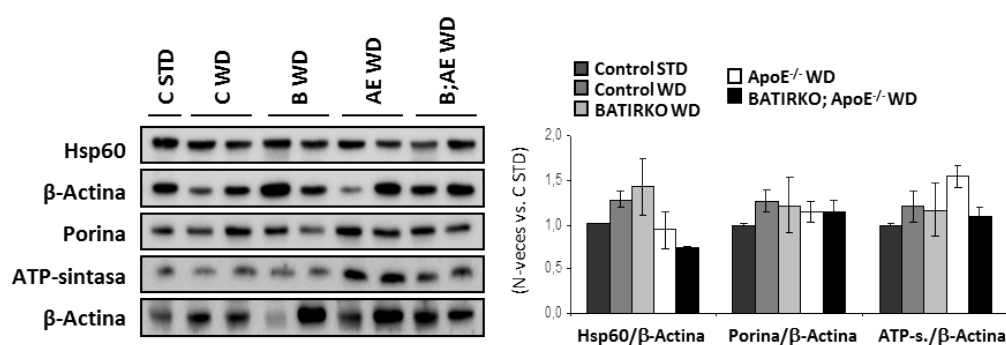


Figura 4.5 Expresión de marcadores de contenido mitocondrial en el BAT del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. Análisis mediante *Western blot* de los niveles proteicos de Hsp60, porina y ATP-sintasa en el BAT de los cinco grupos de animales estudiados. Geles representativos (izquierda) y sus respectivas cuantificaciones (derecha) normalizadas por la β -actina. AE: ApoE^{-/-}; B: BATIRKO; C: Control; STD: dieta estándar; WD: dieta tipo *Western*.

Para comprobar si la lipoatrofia marrón confería susceptibilidad a la obesidad, medimos el ratio entre la masa de WAT visceral (vWAT) y el peso corporal. De esta forma, observamos un incremento de la adiposidad visceral tanto en los ratones BATIRKO como en el grupo de ratones BATIRKO; ApoE^{-/-}, principalmente debida al aumento del compartimento gonadal (gWAT) (**Tabla 4.1**). Además, mediante imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) encontramos que el volumen de grasa corporal total era significativamente mayor en los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD en comparación con los grupos Control STD, BATIRKO WD y ApoE^{-/-} WD (**Figura 4.7**).

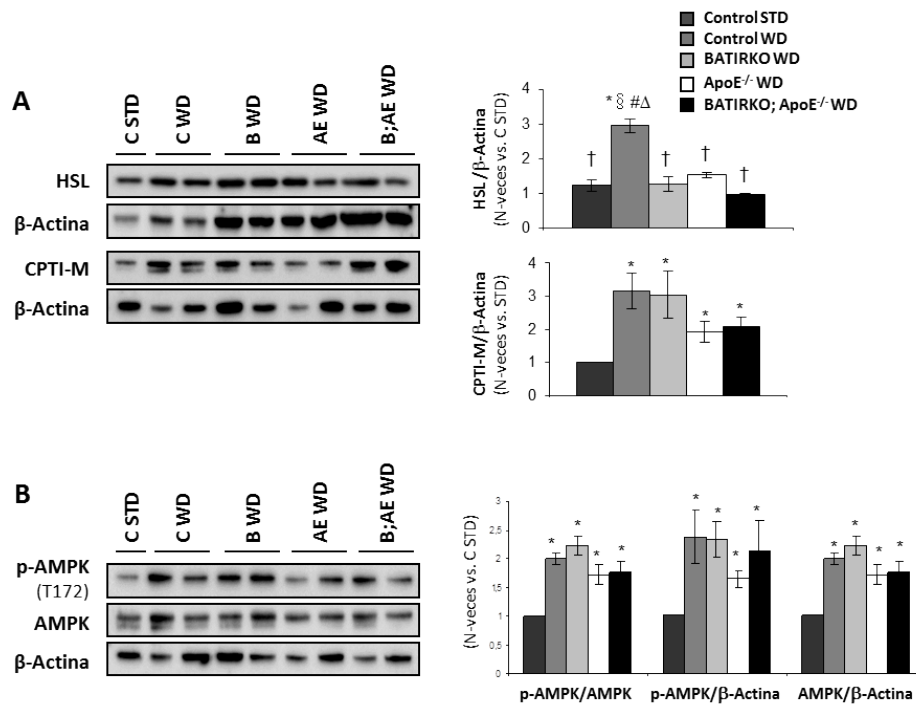


Figura 4.6 Expresión de proteínas implicadas en el metabolismo lipídico en el BAT del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. Geles representativos (izquierda) y cuantificaciones (derecha) respecto a la β-actina de los niveles proteicos de HSL y CPTI-M (A), y de la fosforilación de AMPK (B) analizados mediante *Western blot* en el BAT de los cinco grupos de animales estudiados. AE: ApoE^{-/-}; B: BATIRKO; C: Control; STD: dieta estándar; WD: dieta tipo *Western*. *p<0,05 vs. Control STD; †p<0,05 vs. Control WD; §p<0,05 vs. BATIRKO WD; #p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD; Δp<0,05 vs. BATIRKO; ApoE^{-/-} WD.

El siguiente paso consistió en analizar el perfil lipídico en el plasma de los distintos grupos de animales, encontrando un aumento significativo de los niveles de colesterol y triglicéridos en los ratones ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD en comparación con los grupos Control STD, Control WD o BATIRKO WD (Tabla 4.1 y Figura 4.8). Cuando comparamos los grupos BATIRKO; ApoE^{-/-} WD y ApoE^{-/-} WD, los niveles de colesterol fueron muy similares (Figura 4.8, A); sin embargo, los niveles de triglicéridos resultaron ser significativamente mayores en los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} (Figura 4.8, B).

La lipoatrofia marrón severa, además de alteraciones del metabolismo lipídico, también lleva asociadas alteraciones del metabolismo de la glucosa. En primer lugar, encontramos que los ratones BATIRKO y BATIRKO; ApoE^{-/-} presentaban una glucemia postprandial significativamente elevada (Figura 4.9, A y Tabla 4.1), junto con una marcada hipoinsulinemia (Figura 4.9, B y Tabla 4.1). Asimismo, los distintos grupos de animales fueron sometidos al test de tolerancia a la insulina (ITT) (Figura 4.10, A) y al test de tolerancia a la glucosa (GTT) (Figura 4.10, B), observando una notable intolerancia a la glucosa y cierto grado de intolerancia a la insulina en los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-}. Estas alteraciones de la homeostasis glucídica sugerían, tal y como se había descrito previamente en el modelo BATIRKO (Guerra *et al.*, 2001), un defecto en la secreción de insulina. Así, comprobamos

que, tanto en el ratón BATIRKO como en el BATIRKO; ApoE^{-/-}, la secreción aguda de insulina en respuesta al aporte de glucosa se veía drásticamente reducida (**Figura 4.10, C**).

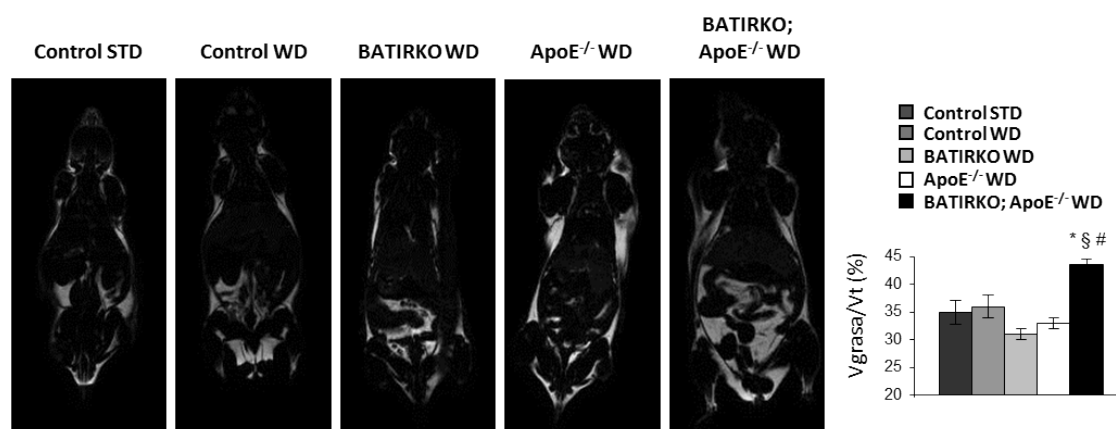


Figura 4.7 Contenido de grasa corporal total en el modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. Imágenes representativas de resonancia magnética nuclear (izquierda) y cuantificación (derecha) del % volumen de grasa (Vgrasa)/ volumen total (Vt) de los cinco grupos de animales estudiados. STD: dieta estándar; WD: dieta tipo *Western*. *p<0,05 vs. Control STD; §p<0,05 vs. BATIRKO WD; #p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD.

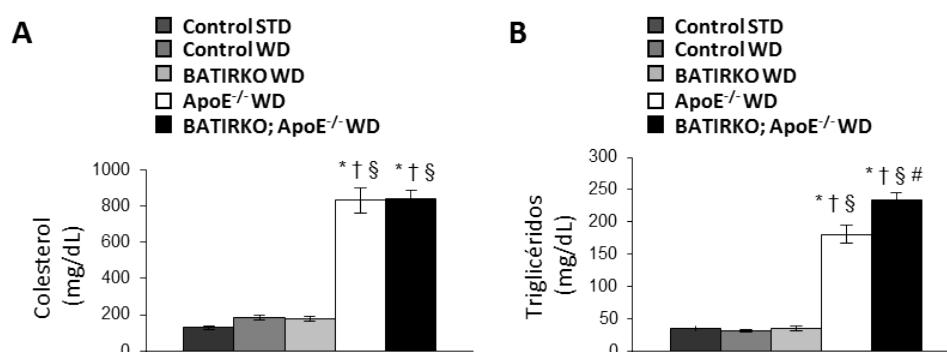


Figura 4.8 Perfil lipídico del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. Niveles plasmáticos de colesterol (A) y triglicéridos (B) de los cinco grupos de animales estudiados. STD: dieta estándar; WD: dieta tipo *Western*. *p<0,05 vs. Control STD; †p<0,05 vs. Control WD; §p<0,05 vs. BATIRKO WD; #p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD.

Para comprobar si la adiposidad visceral y la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia observadas en el ratón BATIRKO; ApoE^{-/-} tenían alguna repercusión a nivel hepático, realizamos tinciones de hematoxilina-eosina en cortes histológicos de hígado procedentes de los cinco grupos de animales y analizamos el contenido lipídico de los mismos mediante tinciones de Oil Red O (**Figura 4.11**). De esta forma, encontramos que los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} presentaban una marcada esteatosis hepática en comparación con el resto de grupos de animales (**Figura 4.11, B y C**), incluidos los ratones ApoE^{-/-} en los que también habíamos observado la presencia de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (**Figura 4.8**).

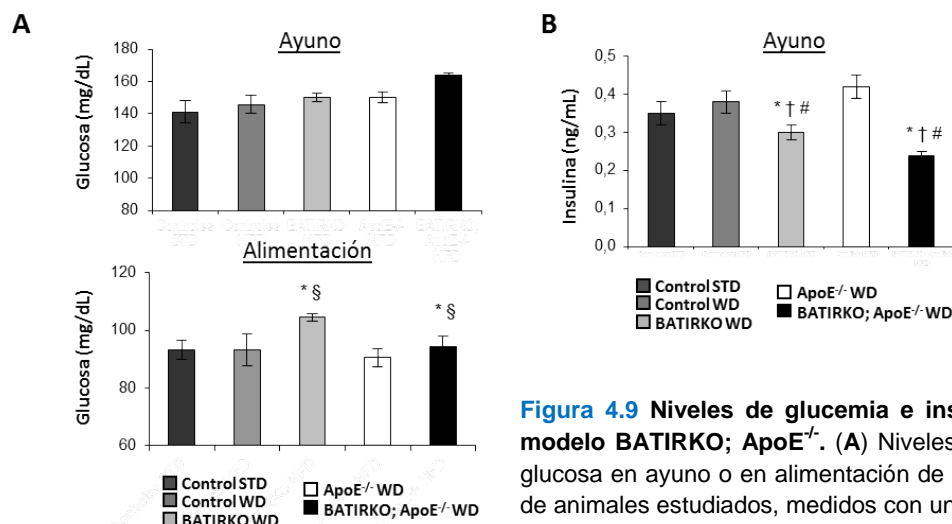


Figura 4.9 Niveles de glucemia e insulinemia en el modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. (A) Niveles plasmáticos de glucosa en ayuno o en alimentación de los cinco grupos de animales estudiados, medidos con un glucómetro. (B) Niveles plasmáticos de insulina de los cinco grupos de animales ayunados, analizados mediante kits de ELISA. STD: dieta estándar; WD: dieta tipo *Western*. *p<0,05 vs. Control STD; †p<0,05 vs. Control WD; §p<0,05 vs. BATIRKO WD; #p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD.

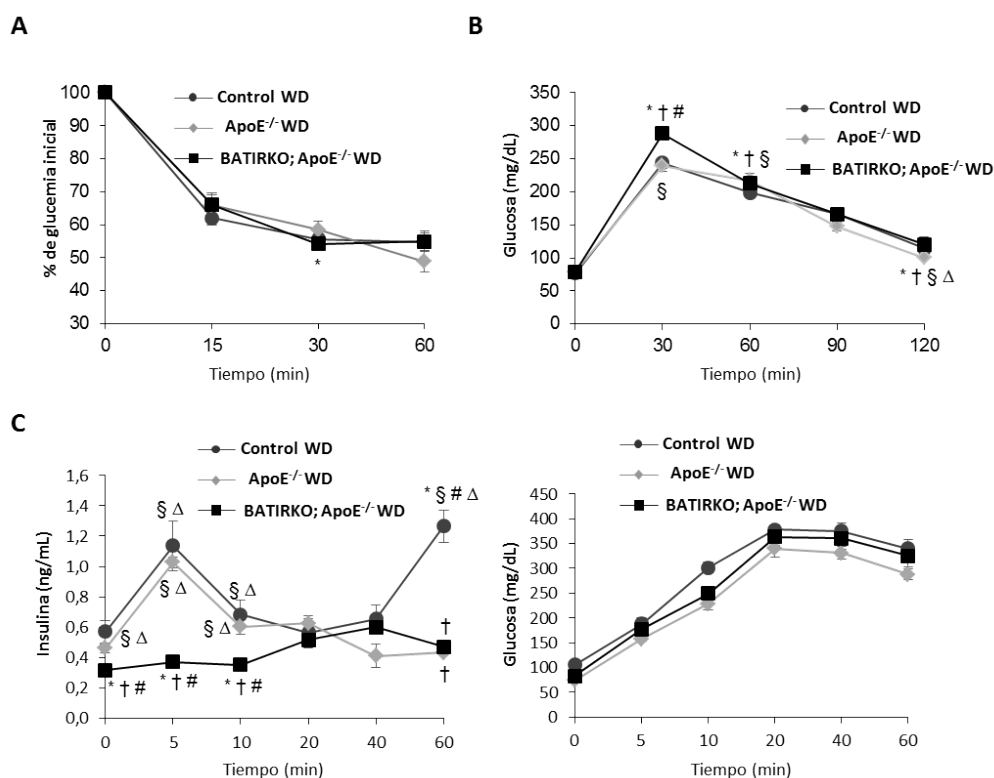


Figura 4.10 Estudio de las alteraciones metabólicas en el modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. Test de tolerancia a la insulina (A), test de tolerancia a la glucosa (B) y test de secreción de insulina (C) en los grupos Control WD, ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD. WD: dieta tipo *Western*. *p<0,05 vs. Control STD; †p<0,05 vs. Control WD; §p<0,05 vs. BATIRKO WD; #p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD; Δp<0,05 vs. BATIRKO; ApoE^{-/-} WD.

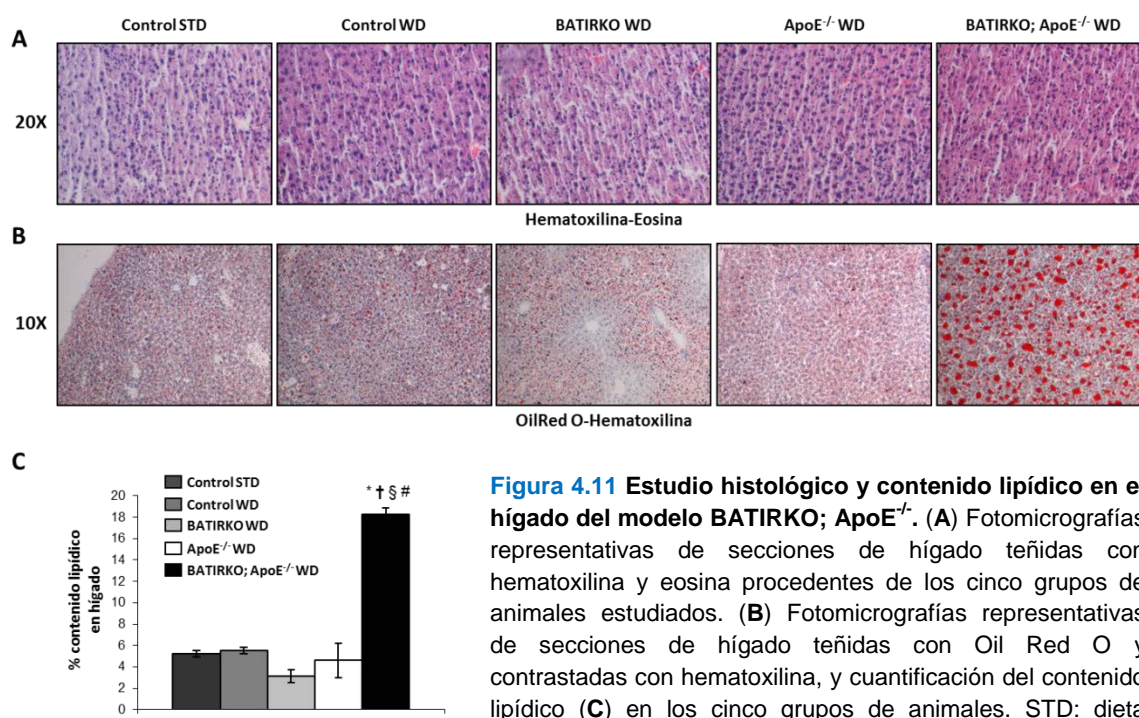


Figura 4.11 Estudio histológico y contenido lipídico en el hígado del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. (A) Fotomicrografías representativas de secciones de hígado teñidas con hematoxilina y eosina procedentes de los cinco grupos de animales estudiados. (B) Fotomicrografías representativas de secciones de hígado teñidas con Oil Red O y contrastadas con hematoxilina, y cuantificación del contenido lipídico (C) en los cinco grupos de animales. STD: dieta estándar; WD: dieta tipo *Western*. *p<0,05 vs. Control STD; †p<0,05 vs. Control WD; §p<0,05 vs. BATIRKO WD; #p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD.

Además, llevamos a cabo experimentos de señalización *in vivo* de insulina y mediante el análisis por *Western blot* de la fosforilación de Akt, una de las principales proteínas implicadas en la vía de señalización de la insulina, vimos que la respuesta a esta hormona se perdía por completo en el hígado del grupo BATIRKO; ApoE^{-/-} (Figura 4.12, A). Esta resistencia hepática a la acción de la insulina estaba acompañada de un aumento significativo de la expresión génica de la citoquina proinflamatoria TNF- α en el hígado de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} en comparación con el grupo ApoE^{-/-} (Figura 4.12, B).

4.1.2 La lipoatrofia marrón severa agrava el proceso aterosclerótico

Con la finalidad de investigar si la lipoatrofia marrón podría causar, además de las alteraciones vasculares en el endotelio que previamente habían sido descritas por nuestro grupo (Gómez-Hernández *et al.*, 2012), un agravamiento del proceso aterogénico, estudiamos el daño vascular en el ratón BATIRKO; ApoE^{-/-} comparativamente con el grupo ApoE^{-/-}. En primer lugar, como parámetros de daño vascular medimos el grado de estenosis, el área de lesión y el contenido lipídico en arcos aórticos teñidos con Oil Red O de los diferentes grupos de animales, encontrando un incremento significativo de todos ellos en los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} respecto al grupo ApoE^{-/-} (Figura 4.13, A). Mediante inmunohistoquímica frente al receptor de macrófagos F4/80, también observamos que el infiltrado de macrófagos presente en el arco aórtico del grupo BATIRKO; ApoE^{-/-} era significativamente mayor que en el arco aórtico de los ratones ApoE^{-/-} (Figura 4.13, B).

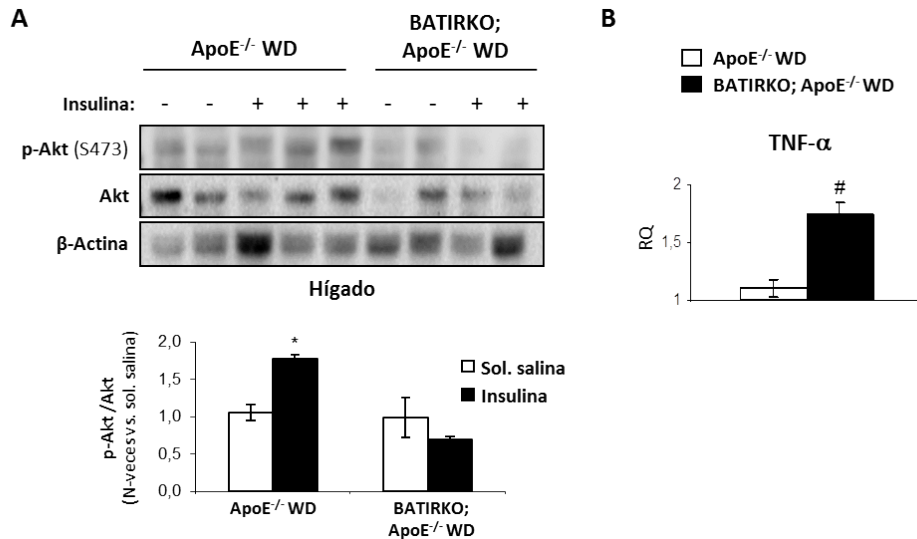


Figura 4.12 Señalización *in vivo* de insulina y niveles de TNF-α en el hígado del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. (A) Análisis mediante Western blot de la fosforilación de Akt (Ser473) en hígado y cuantificación de la misma tras realizar estudios de señalización *in vivo* de insulina en los grupos ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD. WD: dieta tipo Western. *p<0,05 vs. cada grupo con solución salina. (B) Estudio de los niveles de mRNA de *Tnfa* mediante qRT-PCR en el hígado de los grupos ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD. Para el cálculo del RQ se empleó el ΔΔCt referido al ApoE^{-/-} WD. #p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD.

A continuación, analizamos mediante qRT-PCR la expresión de diferentes genes implicados en el proceso aterogénico. Así, observamos una disminución significativa de los niveles del mRNA de la eNOS en la arteria aorta del grupo BATIRKO; ApoE^{-/-} al compararlos tanto con el grupo Control WD (**Figura 4.14, A**) como con el grupo ApoE^{-/-} (**Figura 4.14, B**), lo que favorecería la pérdida de vasodilatación dependiente de NO. Además, en la aorta de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} la expresión de genes de activación endotelial (ET-1 e ICAM-1), marcadores de daño vascular (MCP-1, TNF-α y PAI-1) y del IGF-IR, que se ha visto incrementado en etapas iniciales del proceso aterosclerótico (Polanco *et al.*, 1995; Jia *et al.*, 2007), estaba aumentada de forma significativa en relación al grupo Control WD (**Figura 4.14, A**) y al grupo ApoE^{-/-} WD (**Figura 4.14, B**). Por último, mediante inmunohistoquímica vimos un notable aumento de la expresión de la iNOS en el arco aórtico del ratón BATIRKO; ApoE^{-/-} en comparación con el resto de grupos estudiados, incluido el grupo ApoE^{-/-} (**Figura 4.15**).

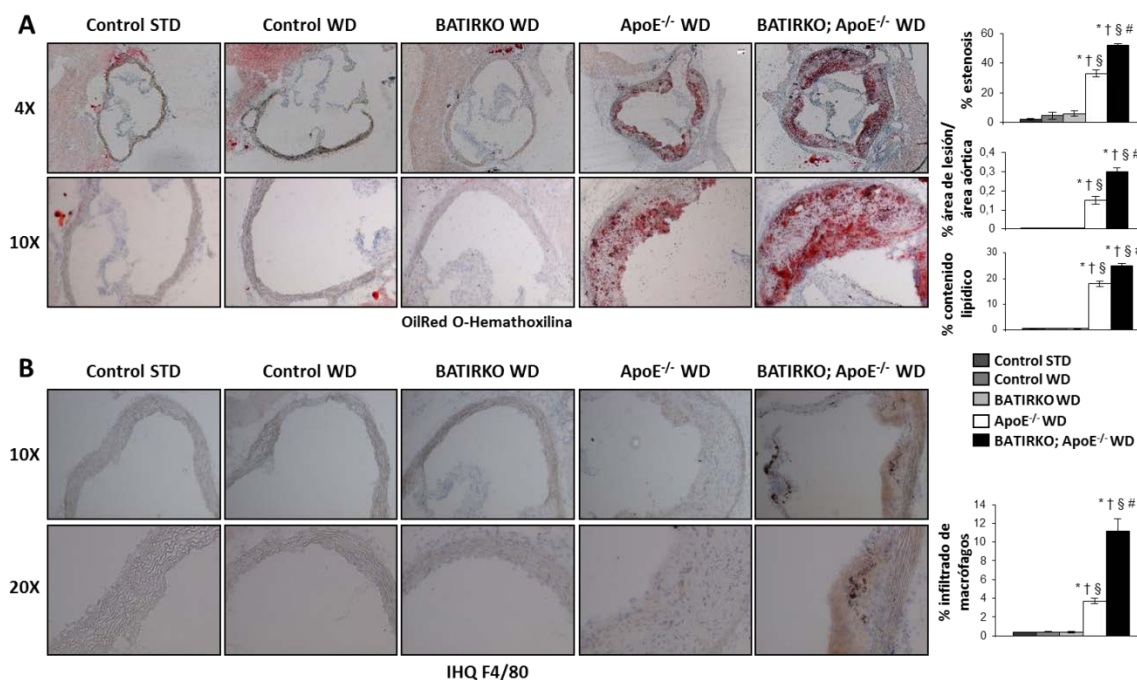


Figura 4.13 Estudio del daño vascular del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. (A) Fotomicrografías representativas de arcos aórticos teñidos con Oil Red O y contrastados con hematoxilina (izquierda) y cuantificación del grado de estenosis, área de lesión y acumulación lipídica (derecha) de los cinco grupos de animales estudiados. (B) Fotomicrografías representativas (izquierda) y cuantificación (derecha) de la inmunohistoquímica frente a F4/80 en arcos aórticos de los cinco grupos de animales estudiados. IHQ: inmunohistoquímica; STD: dieta estándar; WD: dieta tipo *Western*. * $p < 0,05$ vs. Control STD; † $p < 0,05$ vs. Control WD; § $p < 0,05$ vs. BATIRKO WD; # $p < 0,05$ vs. ApoE^{-/-} WD.

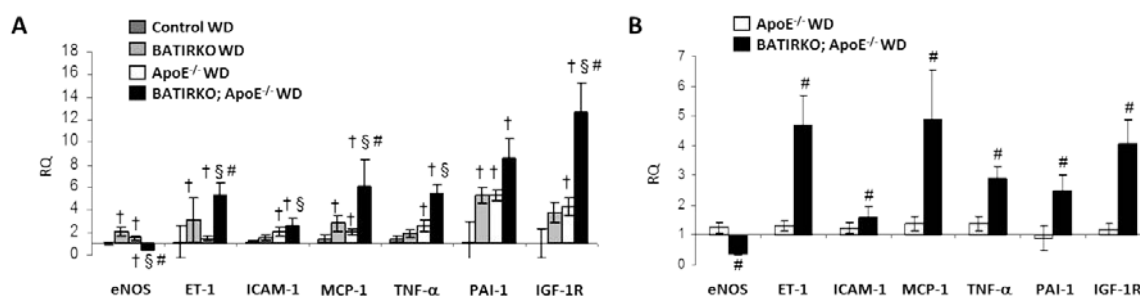


Figura 4.14 Expresión de genes de daño vascular en la arteria aorta del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de mRNA de *enos*, *et1*, *icam1*, *mpc1*, *tnfa*, *pai1*, e *igf1r* en la arteria aorta de los cinco grupos de animales estudiados. Para el cálculo del RQ se empleó el $\Delta\Delta Ct$ referido al Control WD (A) o al ApoE^{-/-} WD (B). WD: dieta tipo *Western*. † $p < 0,05$ vs. Control WD; § $p < 0,05$ vs. BATIRKO WD; # $p < 0,05$ vs. ApoE^{-/-} WD.

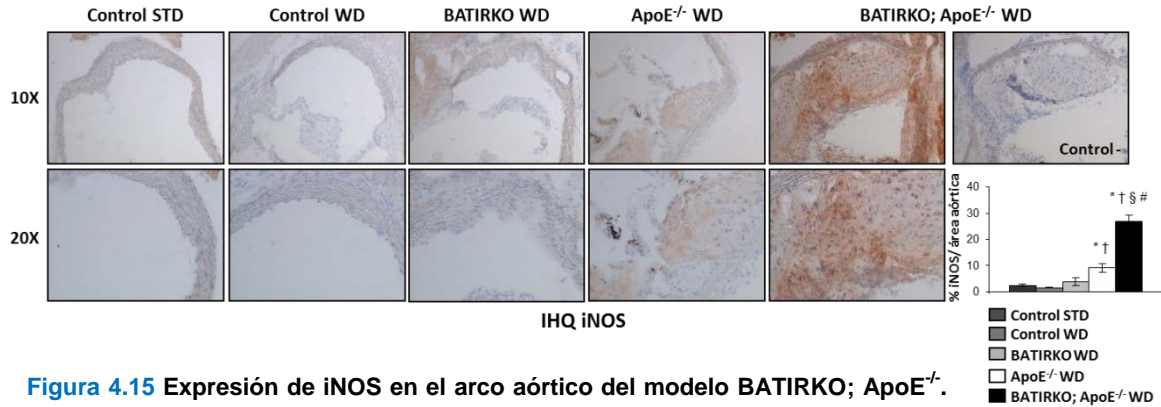


Figura 4.15 Expresión de iNOS en el arco aórtico del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. Fotomicrografías representativas y cuantificación de la inmunohistoquímica frente a iNOS en arcos aórticos de los cinco grupos de animales estudiados. IHQ: inmunohistoquímica; STD: dieta estándar; WD: dieta tipo *Western*. *p<0,05 vs. Control STD; †p<0,05 vs. Control WD; §p<0,05 vs. BATIRKO WD; #p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD.

4.1.3 La lipotrofia marrón severa induce resistencia periférica a la insulina

La ausencia del receptor de insulina específicamente en el BAT inducía una resistencia primaria a la insulina en este tejido, como reflejaba la falta de fosforilación de Akt en respuesta al tratamiento *in vivo* con insulina en los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} (**Figura 4.16**). Asimismo, encontramos una resistencia secundaria a la insulina, pues la administración de insulina no indujo activación de Akt, en la arteria aorta, corazón, gWAT y PVAT torácico (tPVAT) del grupo BATIRKO; ApoE^{-/-} en comparación con el ApoE^{-/-}. Por el contrario, la sensibilidad a la insulina en los compartimentos inguinal (iWAT) y retroperitoneal (rpWAT) del nuevo modelo permanecía inalterada (**Figura 4.16**).

4.1.4 Contribución del BAT, WAT visceral y PVAT torácico a la inflamación observada en el modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}

Quisimos comprobar si el aumento de la adiposidad visceral presente en el ratón BATIRKO; ApoE^{-/-} podría influir en la expresión de adipoquinas proinflamatorias, las cuales serían responsables de las alteraciones metabólicas y vasculares asociadas a dicha adiposidad. Para ello, analizamos mediante qRT-PCR los niveles del mRNA del TNF- α , la leptina y la adiponectina en el BAT y en distintos compartimentos del WAT (**Figura 4.17**). Así, la expresión del TNF- α estaba aumentada en el BAT, gWAT y tPVAT de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} respecto a los ApoE^{-/-} (**Figura 4.17, A**). También observamos un incremento significativo de la leptina en el gWAT y tPVAT del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-} en comparación con el ApoE^{-/-} (**Figura 4.17, B**). En cambio, la adiponectina se encontraba disminuida en el WAT visceral (gWAT y rpWAT) y el tPVAT del grupo BATIRKO; ApoE^{-/-} (**Figura 4.17, B**).

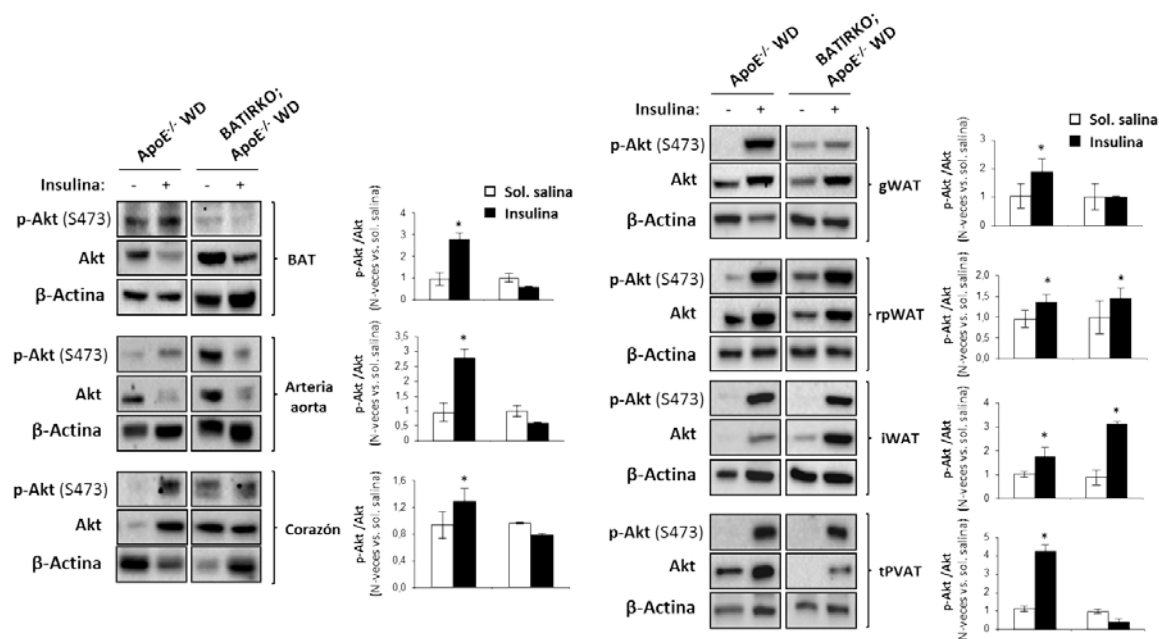


Figura 4.16 Señalización *in vivo* de insulina en el modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. Análisis mediante Western blot (derecha) y cuantificación (izquierda) de la fosforilación de Akt (Ser473) en respuesta a la insulina en el BAT, arteria aorta, corazón, gWAT, rpWAT, iWAT y tPVAT de los grupos ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD. WD: dieta tipo Western; gWAT: WAT gonadal; rpWAT: WAT retroperitoneal; iWAT: WAT inguinal; tPVAT: PVAT torácico. *p<0,05 vs. cada grupo con solución salina.

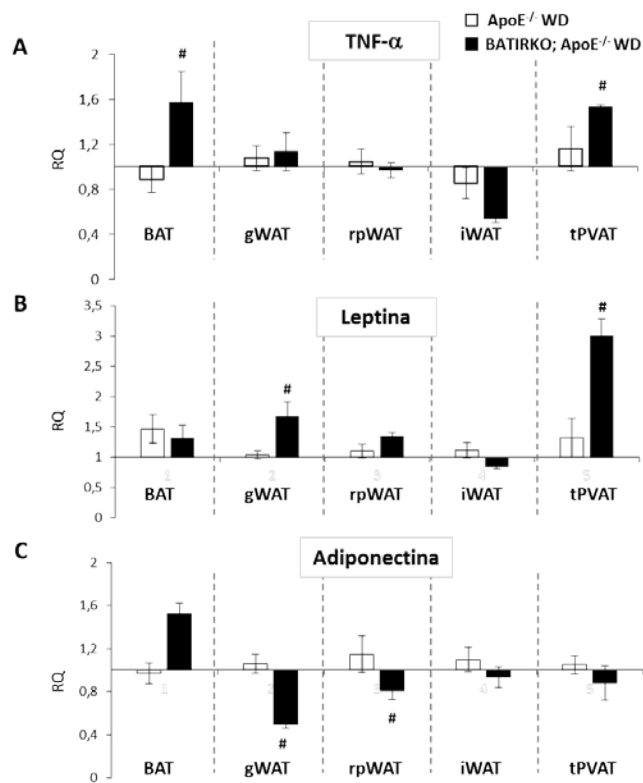


Figura 4.17 Expresión de citoadipoquinas en el órgano adiposo del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}. Niveles de expresión de TNF-α, leptina y adiponectina analizados mediante qRT-PCR en el BAT, gWAT, rpWAT, iWAT y tPVAT de los grupos ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD. WD: dieta tipo Western; gWAT: WAT gonadal; rpWAT: WAT retroperitoneal; iWAT: WAT inguinal; tPVAT: PVAT torácico. #p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD.

4.2 El papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos en las fases iniciales del proceso aterosclerótico

En la segunda parte de esta tesis nos centramos en el estudio de los mecanismos moleculares que intervienen en las fases iniciales del proceso aterosclerótico y, específicamente, en el papel que juegan las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos IR/IGF-IR en la migración de las VSMCs. Para ello, utilizamos cuatro líneas de VSMCs de aorta de ratón, previamente generadas y caracterizadas en nuestro laboratorio (Gómez-Hernández *et al.*, 2013): IRLoxP^{+/+} VSMCs (con IR), IR^{-/-} VSMCs (sin IR), IRA VSMCs (expresan exclusivamente la isoforma IRA) e IRB VSMCs (solo expresan la isoforma IRB). En primer lugar, comprobamos mediante *Western blot* frente a la cadena β del IR la ausencia de expresión en las IR^{-/-} VSMCs, así como niveles similares del IR en las IRLoxP^{+/+}, IRA e IRB VSMCs (**Figura 4.18**). Analizamos también la expresión del IGF-IR en las cuatro líneas celulares y encontramos un aumento significativo en las IR^{-/-} e IRB VSMCs en comparación con las IRLoxP^{+/+} VSMCs. Por el contrario, las células que expresan únicamente la isoforma IRA presentaban niveles de IGF-IR significativamente menores (**Figura 4.18**).

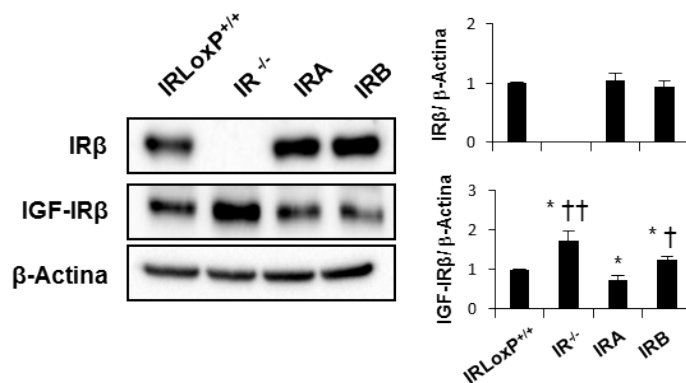


Figura 4.18 Expresión del IR y del IGF-IR en las VSMCs. Geles representativos (izquierda) y cuantificación (derecha) de la expresión del IR y del IGF-IR analizada mediante *Western blot* en las cuatro líneas de VSMCs. *p<0,05 vs. IRLoxP^{+/+} VSMCs; †p<0,05, ††p<0,005 vs. IRA VSMCs.

4.2.1 Señalización de insulina e IGFs en las células de músculo liso vascular

Estudiamos las principales vías de señalización inducidas por la insulina o los IGFs en las cuatro líneas de VSMCs. Las células se estimularon con insulina, IGF-I o IGF-II a una concentración de 10 nmol/L durante 10 minutos y se analizó por *Western blot* la fosforilación de Akt, p70 S6K y p44/42 MAPK. Como era de esperar, las células sin IR no respondieron a la estimulación con insulina en relación a la activación de Akt y presentaron un leve aumento de la fosforilación de p70 S6K y p44/42 MAPK que no resultó estadísticamente significativo. Por el contrario, en las IRLoxP^{+/+} VSMCs observamos un incremento significativo de p-Akt, p-p70 S6K y p-p44/42 MAPK inducido por los tres estímulos, siendo este mayor cuando las

células se estimularon con IGF-I o IGF-II que con insulina (**Figura 4.19**). Además, la activación de las tres quinasas estudiadas en respuesta a la insulina, IGF-I o IGF-II fue significativamente mayor en las IRA VSMCs que en las IRB VSMCs (**Figura 4.19**).

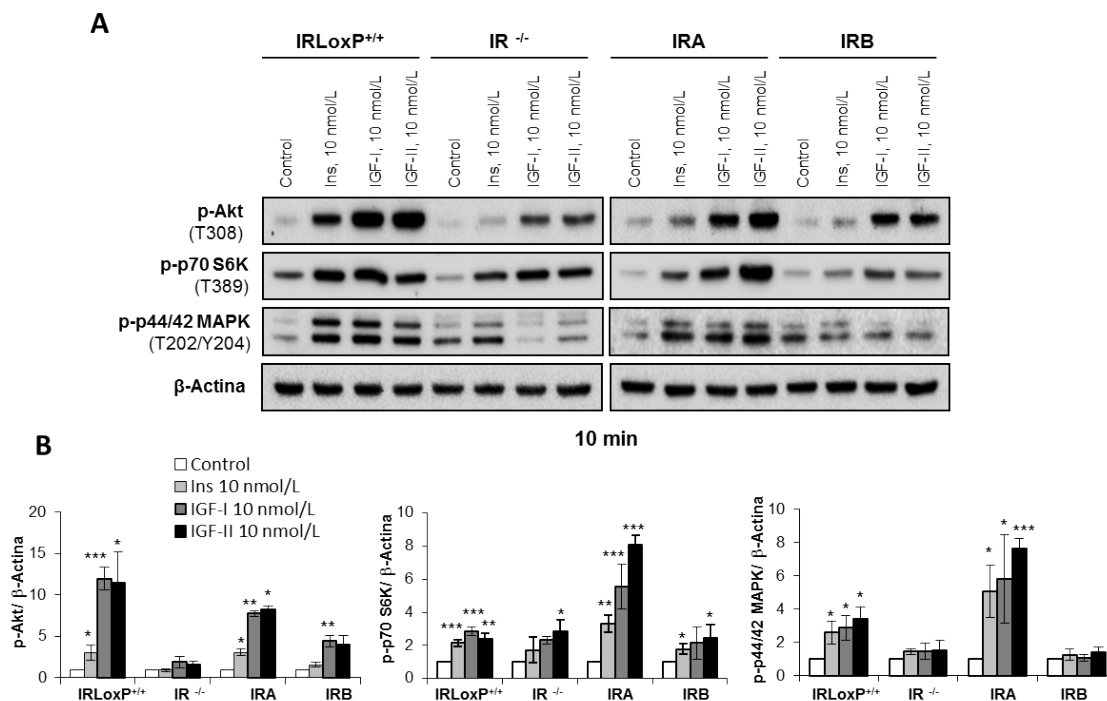


Figura 4.19 Señalización de insulina e IGFs en las VSMCs. Análisis por *Western blot* (A) y cuantificación (B) de la fosforilación de Akt (Thr308), p70 S6K (Thr389) y p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) en las cuatro líneas celulares estimuladas con insulina (10 nmol/L), IGF-I (10 nmol/L) o IGF-II (10 nmol/L) durante 10 min. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001 vs. cada control.

La insulina y los IGFs son capaces de unir y activar, además de su propio receptor, el IGF-IR y el IR respectivamente, aunque con diferente afinidad y eficacia (Vigneri *et al.*, 2016), por lo que la señalización observada en las líneas de VSMCs (a excepción de las IR^{-/-} VSMCs que solo expresan el IGF-IR) podría ser el resultado de la activación de uno o ambos receptores. Por esta razón, quisimos investigar en las IRLoxP^{+/+} VSMCs, que expresan las dos isoformas del IR y el IGF-IR, la posible existencia de una reacción cruzada de cada uno de los ligandos con los dos receptores a la dosis empleada en los estudios de señalización. Las células fueron estimuladas con insulina (10 nmol/L o 100 nmol/L), IGF-I (10 nmol/L) o IGF-II (10 nmol/L) durante 5 minutos y los extractos proteicos se empelaron para inmunoprecipitar la cadena β del IR o del IGF-IR. La activación de los receptores se estudió mediante *Western blot* frente a un anticuerpo que reconoce proteínas fosforiladas en residuos de tirosina (**Figura 4.20**). Así, encontramos que la insulina activaba su propio receptor de forma dependiente de la dosis y, además, era capaz de inducir la fosforilación del IGF-IR a una concentración suprafisiológica de 100 nmol/L. El IGF-I y el IGF-II indujeron un nivel similar de

fosforilación del IGF-IR, mientras que la activación del IR en respuesta al IGF-I fue mayor que la observada en el caso de la estimulación con IGF-II.

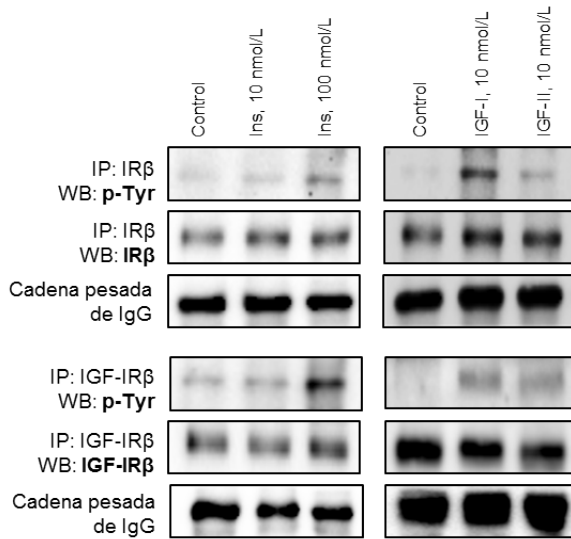


Figura 4.20 Activación del IR y del IGF-IR en respuesta a insulina o IGFs en las VSMCs. Inmunoprecipitación del IRβ (panel superior) o del IGF-IRβ (panel inferior) para analizar mediante *Western blot* su fosforilación en tirosina inducida por la estimulación con insulina (10 nmol/L o 100 nmol/L), IGF-I (10 nmol/L) o IGF-II (10 nmol/L) durante 5 min.

4.2.2 Contribución diferencial de las isoformas del IR y del IGF-IR a la migración de las células de músculo liso vascular

El aumento de la proliferación y migración de las células de músculo liso vascular es un evento clave en el crecimiento de la placa durante las etapas iniciales del proceso ateroesclerótico (Bennett *et al.*, 2016). Las VSMCs migran desde la capa media a la íntima donde proliferan y secretan componentes de la matriz extracelular, conduciendo a la formación de la cápsula fibrosa característica de las lesiones organizadas.

Previamente habíamos demostrado que la isoforma IRA confiere una ventaja proliferativa a las VSMCs (Gómez-Hernández *et al.*, 2013), por lo que nos planteamos si un papel diferencial de las isoformas del IR tendría lugar también en la migración de estas células. Con esta finalidad llevamos a cabo estudios de migración mediante el ensayo de cierre de herida en las cuatro líneas celulares, determinando el porcentaje de cierre a las 6, 12 y 24 horas de realizar la herida (**Figura 4.21**). La mayor migración fue observada en las IRLoxP^{+/+} VSMCs, siendo significativamente más elevada que la migración de las IR^{-/-} e IRB VSMCs a todas las horas de estudio (**Figura 4.21, B**). Asimismo, las IRA VSMCs presentaron porcentajes de cierre de herida significativamente mayores que las IRB VSMCs a las 6, 12 y 24 horas (**Figura 4.21, B**), lo que sugiere una mayor capacidad migratoria de las células que expresan exclusivamente la isoforma IRA en condiciones basales.

A continuación analizamos el efecto de la estimulación con insulina, IGF-I o IGF-II en la migración de las VSMCs. En primer lugar, encontramos un incremento significativo de la migración inducida por la insulina en las IRA VSMCs a las 12 y 24 horas de realizar la herida, mientras que el resto de líneas celulares no mostraron diferencias significativas respecto a su

migración basal (**Figura 4.22**). El IGF-I potenció marcadamente la migración de todas las líneas celulares, con incrementos significativos del porcentaje de cierre de herida a las 12 y 24 horas (**Figura 4.23**). El hecho de que incrementara la migración de las células carentes del IR sugiere que el efecto del IGF-I estaría mediado principalmente a través de su receptor, el IGF-IR. En cambio, el efecto del IGF-II fue mucho más discreto y solamente produjo un aumento significativo de la migración de las IRA VSMCs a las 12 y 24 horas tras la realización de la herida (**Figura 4.24**). Estos resultados sugieren una diferente contribución del IR y del IGF-IR a la migración de las VSMCs, siendo este último el principal mediador de la migración estimulada por el IGF-I. Por el contrario, la insulina y el IGF-II parecen requerir la presencia de la isoforma IRA para inducir la migración de las VSMCs.

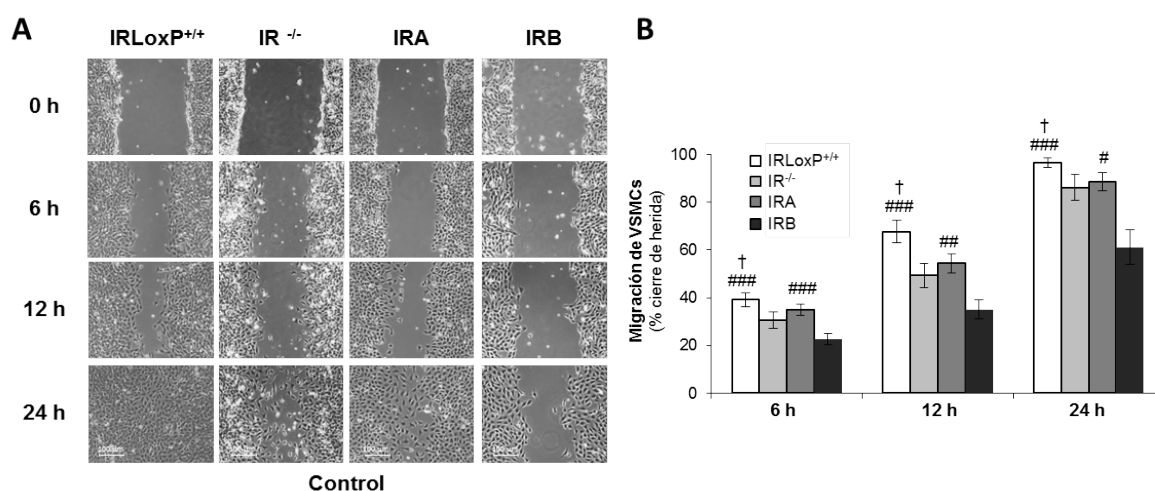


Figura 4.21 Migración basal de las VSMCs. (A) Fotomicrografías (aumento 10x) representativas de los ensayos de cierre de herida en las cuatro líneas de VSMCs a las 6, 12 y 24 horas de realizar la herida. (B) Cuantificación del porcentaje de cierre de herida (usando el programa TScratch) a los diferentes tiempos de estudio con respecto al tiempo 0. Los experimentos fueron realizados 4-7 veces. †p<0,05 vs. IR^{-/-} VSMCs; #p<0,05, ##p<0,005, ###p<0,001 vs. IRB VSMCs.

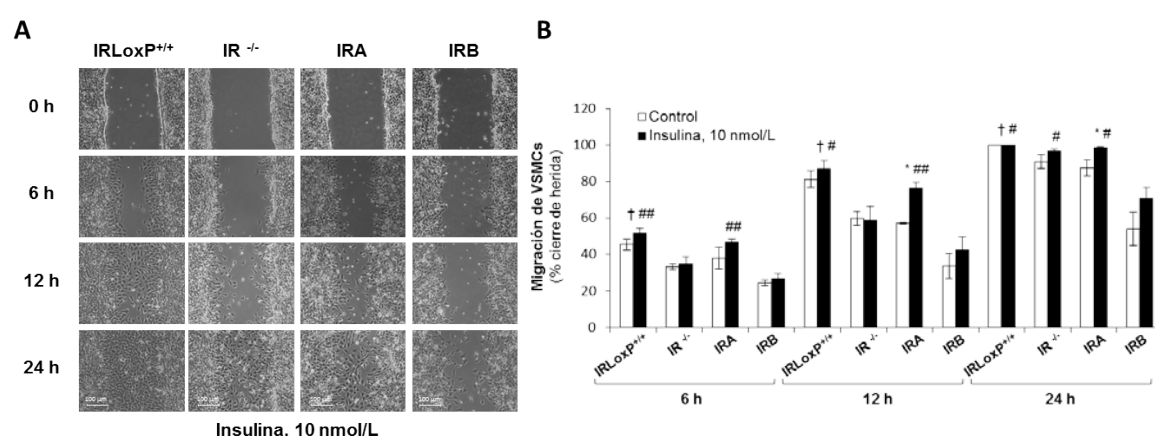


Figura 4.22 Efecto de la insulina en la migración de las VSMCs. (A) Fotomicrografías (aumento 10x) representativas de los ensayos de cierre de herida en las cuatro líneas de VSMCs estimuladas con insulina (10 nmol/L) a las 6, 12 y 24 horas de realizar la herida. (B) Cuantificación del porcentaje de cierre de herida a los diferentes tiempos de estudio con respecto al tiempo 0. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. *p<0,05 vs. cada control; †p<0,05 vs. IR^{-/-} VSMCs; #p<0,05, ##p<0,005 vs. IRB VSMCs.

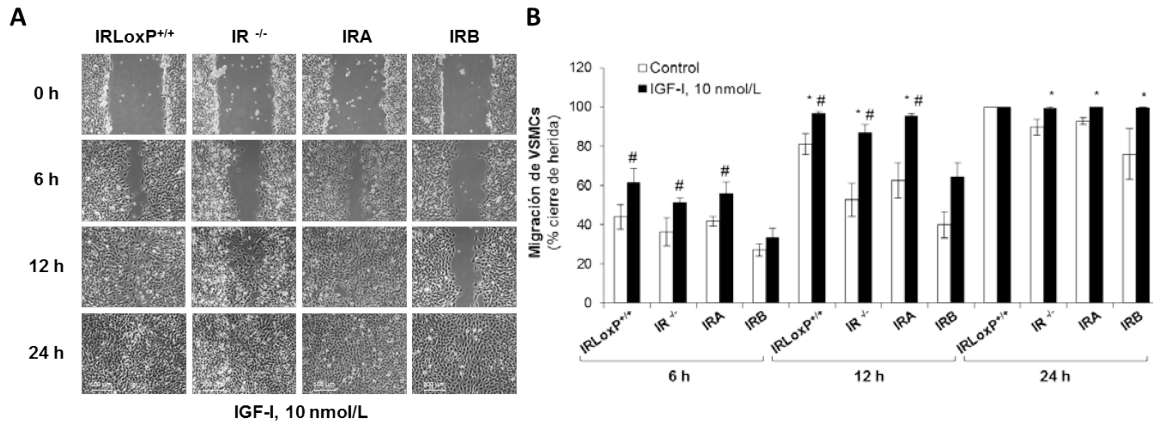


Figura 4.23 Efecto del IGF-I en la migración de las VSMCs. (A) Fotomicrografías (aumento 10x) representativas de los ensayos de cierre de herida en las cuatro líneas de VSMCs estimuladas con IGF-I (10 nmol/L) a las 6, 12 y 24 horas de realizar la herida. (B) Cuantificación del porcentaje de cierre de herida a los diferentes tiempos de estudio con respecto al tiempo 0. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. * $p < 0,05$ vs. cada control; # $p < 0,05$ vs. IRB VSMCs.

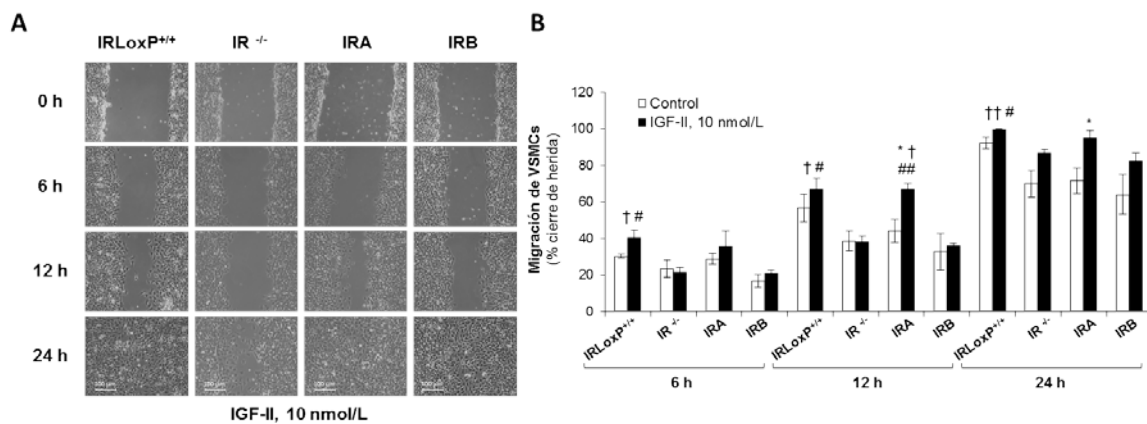


Figura 4.24 Efecto del IGF-II en la migración de las VSMCs. (A) Fotomicrografías (aumento 10x) representativas de los ensayos de cierre de herida en las cuatro líneas de VSMCs estimuladas con IGF-II (10 nmol/L) a las 6, 12 y 24 horas de realizar la herida. (B) Cuantificación del porcentaje de cierre de herida a los diferentes tiempos de estudio con respecto al tiempo 0. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. * $p < 0,05$ vs. cada control; † $p < 0,05$, †† $p < 0,005$ vs. IR^{-/-} VSMCs; # $p < 0,05$, ## $p < 0,005$ vs. IRB VSMCs.

Es conocido que las metaloproteinasas de matriz facilitan la eliminación de la membrana basal próxima a las VSMCs de la capa media arterial permitiendo su migración hacia la íntima durante el proceso aterosclerótico. Además, las VSMCs producen una amplia variedad de MMPs, algunas de forma espontánea y otras en respuesta ciertos estímulos como la lesión vascular, factores de crecimiento o mediadores inflamatorios (Newby, 2006). En este sentido, uno de los mecanismos que explicarían, al menos en parte, las diferencias observadas en la migración de las IRA y las IRB VSMCs podría ser una activación diferencial de ciertas MMPs, en concreto las gelatinasas MMP-2 y MMP-9, las cuales han sido implicadas en la migración de las VSMCs (Kuzuya *et al.*, 2003; Cho y Reidy, 2002; Johnson y Galis, 2004). Por esta razón,

estudiamos la actividad de ambas enzimas mediante zimografía de gelatina y encontramos que la actividad de la MMP-2 era mucho mayor en las células que solo expresan la isoforma IRA que en las IRB VSMCs, tanto en condiciones basales como en presencia de insulina, IGF-I o IGF-II durante 12 y 24 horas (**Figura 4.25**). No se detectó, sin embargo, actividad de la MMP-9 en ninguna de las dos líneas celulares estudiadas.

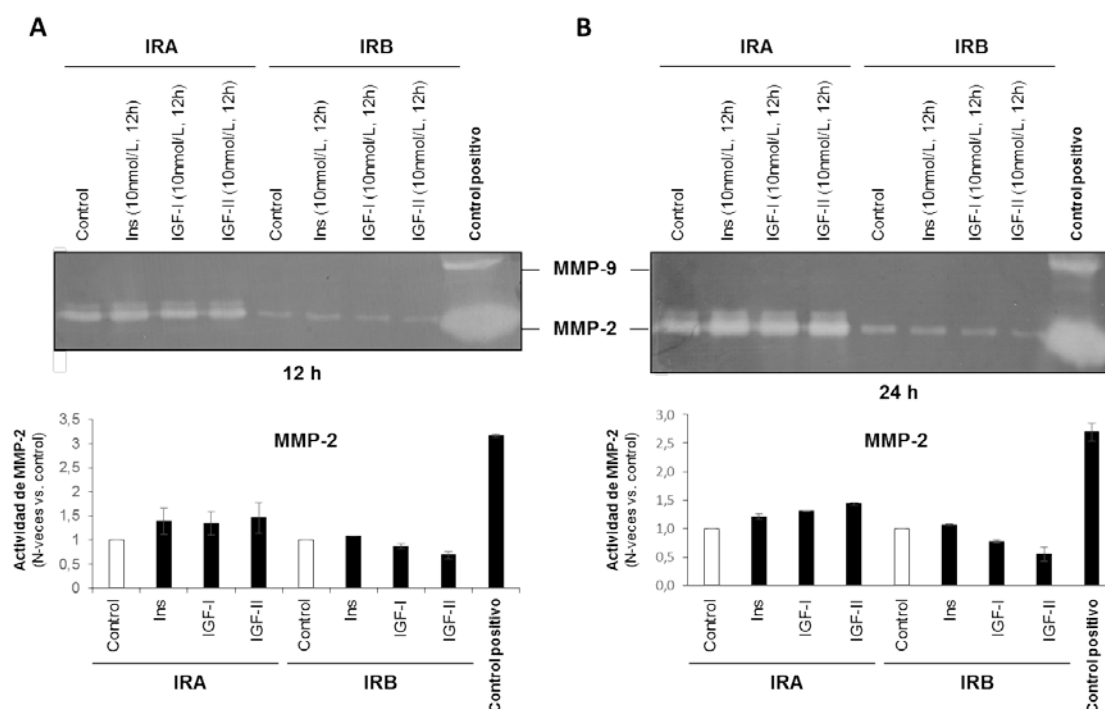


Figura 4.25 Análisis de la actividad de las MMP-2 y MMP-9 mediante zimografía de gelatina en las IRA e IRB VSMCs estimuladas con insulina (10 nmol/L), IGF-I (10 nmol/L) o IGF-II (10 nmol/L) durante 12 (A) o 24 horas (B). Se empleó FBS como control positivo.

4.2.3 La inhibición del IGF-IR reduce notablemente la migración de las células de músculo liso vascular

Con el objetivo de profundizar en el estudio del papel que juega el IGF-IR en la migración de las VSMCs, utilizamos un inhibidor específico de dicho receptor, la picropodofilina (PPP), que bloquea la fosforilación de la tirosina 1136 situada en el *loop* de activación del dominio tirosina quinasa del IGF-IR, sin afectar a la fosforilación del IR (Vasilcanu *et al.*, 2004). En primer lugar, llevamos a cabo una curva de dosis y observamos una inhibición completa de la fosforilación del IGF-IR inducida por el IGF-I tras un tratamiento previo de una hora con PPP a una concentración de 5 $\mu\text{mol/L}$ o superior en las IRLoxP^{+/+} VSMCs. De forma similar, una dosis de 5 $\mu\text{mol/L}$ de PPP bloqueó por completo la activación del IGF-IR en el resto de líneas celulares (**Figura 4.26**). Esta concentración de PPP fue la empleada en los experimentos de migración, observando una reducción estadísticamente significativa del porcentaje de cierre de herida a las 12 horas en las cuatro líneas de VSMCs (**Figura 4.27, A y B**), lo que pone de

4. Resultados

manifiesto una importante contribución del IGF-IR a la migración de las VSMCs en condiciones basales. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de la migración entre las diferentes líneas de VSMCs (**Figura 4.27, C**), sugiriendo que el efecto causado por la inhibición del IGF-IR es independiente de la presencia del IR o de cuál de las isoformas del IR se encuentre predominantemente expresada.

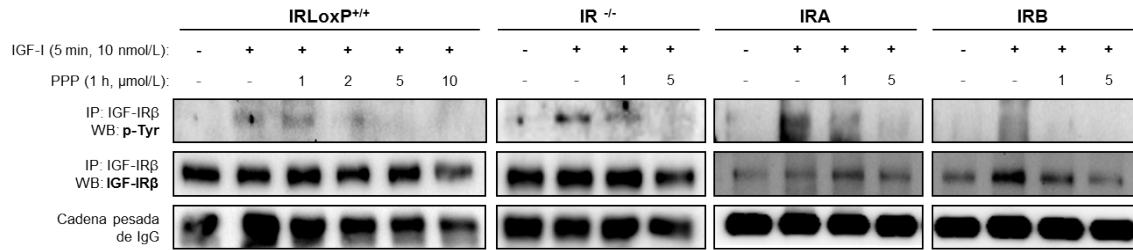


Figura 4.26 Efecto de la picropodofilina (PPP) en la activación del IGF-IR en las VSMCs. Se inmunoprecipitó la cada β del IGF-IR y se analizó mediante *Western blot* su fosforilación en residuos de tirosina en las cuatro líneas de VSMCs previamente tratadas con PPP a diferentes dosis y estimuladas con IGF-I (10 nmol/L) durante 5 min.

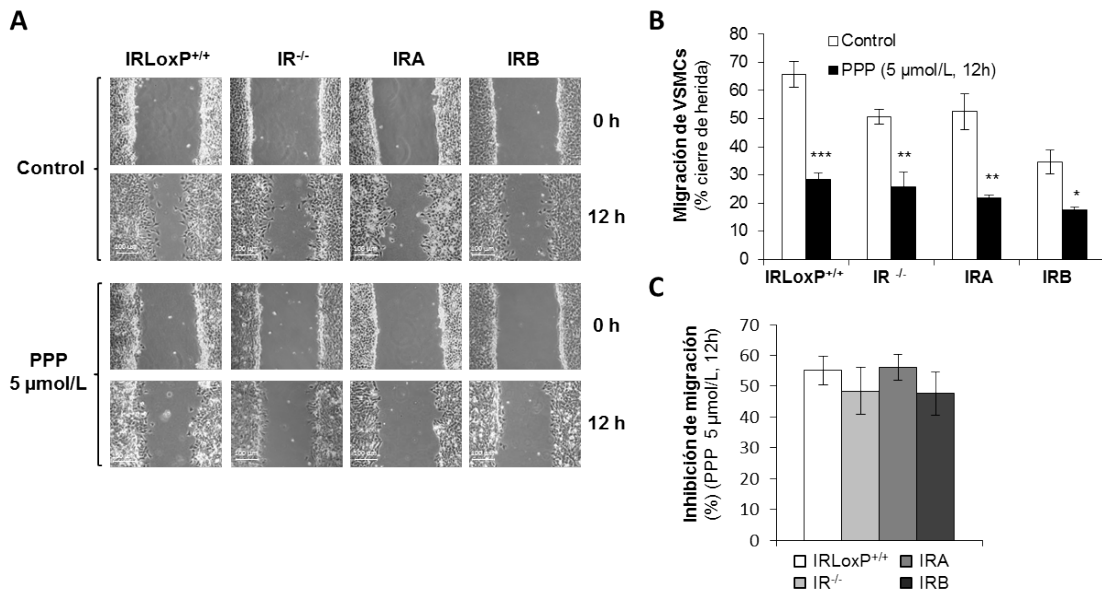


Figura 4.27 Efecto de la inhibición del IGF-IR en la migración basal de las VSMCs. (A) Fotomicrografías (aumento 10x) representativas de los ensayos de cierre de herida en las cuatro líneas de VSMCs en presencia de PPP (5 μ mol/L) a las 12 horas de realizar la herida. Cuantificación del porcentaje de cierre de herida con respecto al tiempo 0 (B) y del porcentaje de inhibición de la migración basal de las VSMCs (C). Los experimentos fueron realizados 4-7 veces. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$ vs. cada control.

Seguidamente estudiamos el efecto de la inhibición del IGF-IR en la migración de las VSMCs estimulada por la insulina o los IGFs (**Figura 4.28**). Curiosamente, el tratamiento con PPP suprimió por completo la migración inducida por la insulina en las IRB VSMCs (inhibición del $114,7 \pm 12,3$ %), mientras que en las IRLoxP^{+/+} e IRA VSMCs la inhibición fue solo parcial ($59 \pm 5,5$ % y $46,2 \pm 7$ %, respectivamente) (**Figura 4.28, A**), lo que sugiere que la isoforma

IRB, pero no la IRA, requiere la presencia del IGF-IR para inducir la migración en respuesta a la insulina. En cuanto a la migración mediada por el IGF-I, encontramos una reducción de aproximadamente la mitad como resultado de la inhibición del IGF-IR por PPP en todas las líneas de VSMCs estudiadas ($56,9 \pm 4,9$ % en las IRLoxP^{+/+}, $52,2 \pm 8$ % en las IRA y $41,8 \pm 1,7$ % en las IRB VSMCs) (**Figura 4.28, B**). Por último, el tratamiento con PPP causó una inhibición de la migración inducida por el IGF-II mucho mayor en las IRB VSMCs ($93 \pm 18,3$ %) que la observada en las IRLoxP^{+/+} e IRA VSMCs ($36,9 \pm 16,6$ % y $66,9 \pm 11,3$ %, respectivamente) (**Figura 4.28, C**).

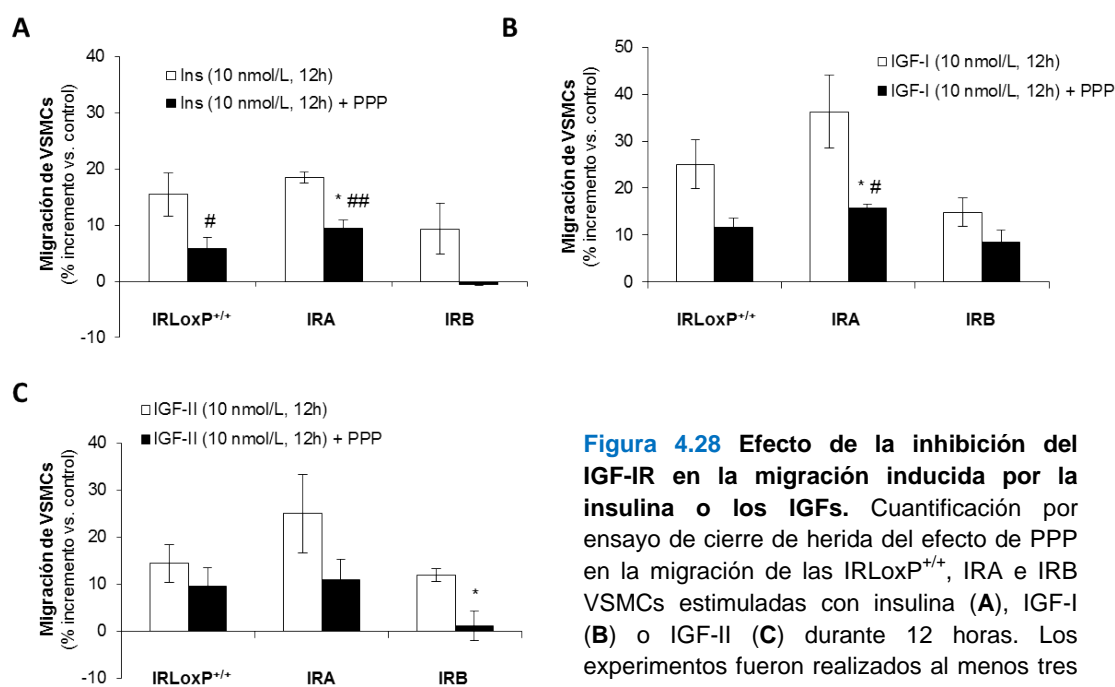


Figura 4.28 Efecto de la inhibición del IGF-IR en la migración inducida por la insulina o los IGFs. Cuantificación por ensayo de cierre de herida del efecto de PPP en la migración de las IRLoxP^{+/+}, IRA e IRB VSMCs estimuladas con insulina (**A**), IGF-I (**B**) o IGF-II (**C**) durante 12 horas. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. * $p < 0,05$ vs. cada control; # $p < 0,05$, ## $p < 0,005$ vs. IRB VSMCs.

4.2.4 La insulina y el IGF-II estimulan la formación de receptores híbridos IRA/IGF-IR en las células de músculo liso vascular

En células que expresan tanto el IR como el IGF-IR, las subunidades $\alpha\beta$ del IR pueden formar heterodímeros con subunidades $\alpha\beta$ del IGF-IR dando lugar a receptores híbridos IR/IGF-IR (Soos y Siddle, 1989; Bailyes *et al.*, 1997). Para investigar la formación de estos receptores híbridos en las VSMCs, los extractos proteicos procedentes de las IRLoxP^{+/+}, IRA e IRB VSMCs se emplearon para inmunoprecipitar la cadena β del IR, analizando seguidamente su asociación con el IGF-IR mediante *Western blot* (**Figura 4.29, A**). En todas las líneas celulares estudiadas existía una asociación basal entre el IR y el IGF-IR. Sin embargo, cuando las células se estimularon con insulina o IGF-II, pero no con IGF-I, durante 12 horas, solo observamos un incremento significativo de la expresión de los receptores híbridos IRA/IGF-IR en las IRA VSMCs. Además, medimos la expresión del IR y del IGF-IR en los extractos proteicos totales y encontramos un aumento de la isoforma IRA, con un nivel

similar de IGF-IR, en respuesta a la insulina o al IGF-II (**Figura 4.29, B**). Estos resultados son coherentes con la mayor migración observada en las IRA VSMCs tras la estimulación con insulina o IGF-II durante 12 horas (**Figuras 4.22 y 4.24**).

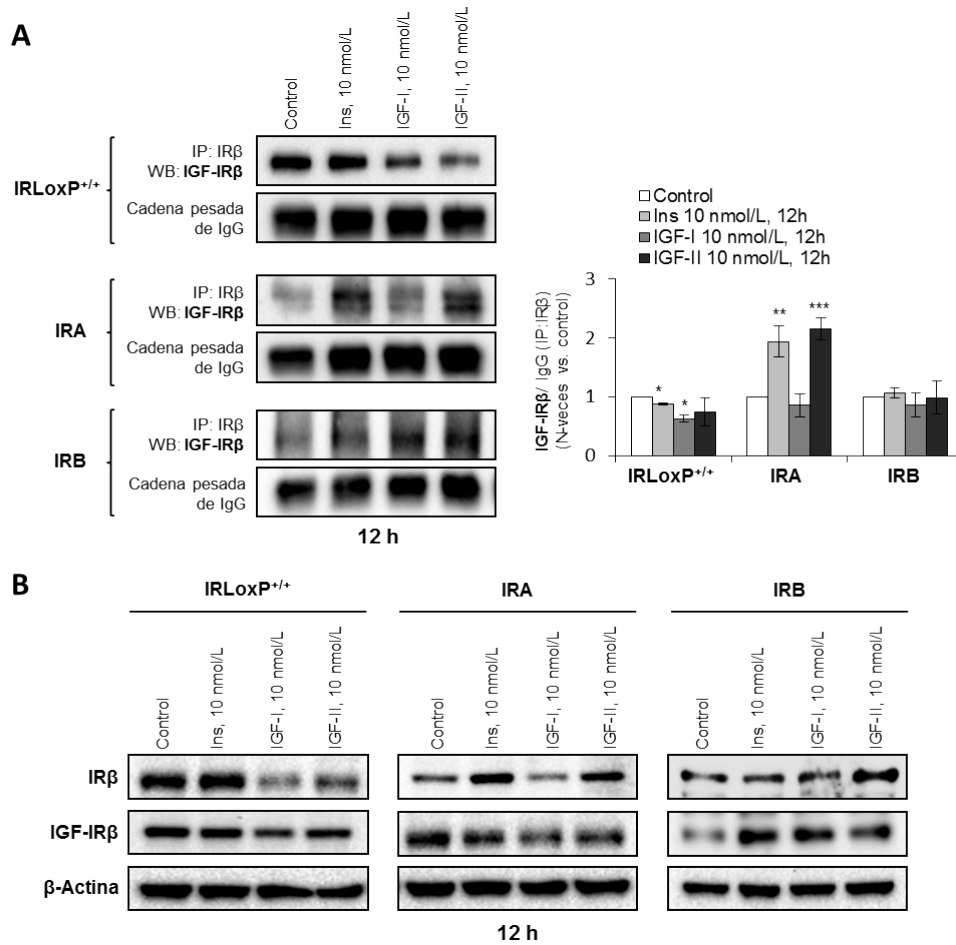


Figura 4.29 Formación de receptores híbridos IRA/IGF-IR o IRB/IGF-IR en las VSMCs. **(A)** Inmunoprecipitación del IRβ seguida de *Western blot* frente al IGF-IRβ y su cuantificación en las IRLoxP^{+/+}, IRA e IRB VSMCs estimuladas con insulina, IGF-I o IGF-II durante 12 horas. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$ vs. cada control. **(B)** Análisis por *Western blot* de la expresión del IR y del IGF-IR en las IRLoxP^{+/+}, IRA e IRB VSMCs estimuladas con insulina, IGF-I o IGF-II durante 12 horas.

4.2.5 El papel de las isoformas el IR y del IGF-IR en la migración de las VSMCs en un modelo experimental de aterosclerosis

Para estudiar el papel de las isoformas del IR y del IGF-IR en la aterosclerosis experimental, utilizamos el modelo ApoE^{-/-} sometido a dieta tipo *Western* (21 % de kcal aportadas por la grasa), analizando diferentes parámetros fisiológicos y metabólicos a las 8, 12, 18 y 24 semanas de edad. Este modelo presentaba hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia a todas las semanas de edad, sin observar alteraciones en el peso corporal ni en los niveles plasmáticos de glucosa o insulina (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.2 Perfil metabólico y lipídico del modelo ApoE^{-/-} WD de 8, 12, 18 y 24 semanas de edad

	8 semanas		12 semanas		18 semanas		24 semanas	
	Control (n = 5)	ApoE ^{-/-} (n = 5)	Control (n = 8)	ApoE ^{-/-} (n = 8)	Control (n = 8)	ApoE ^{-/-} (n = 8)	Control (n = 8)	ApoE ^{-/-} (n = 8)
Peso corporal (g)	20,4±0,1	21,3±0,6	24,7±0,5	24,3±0,5	27,7±1	26,5±0,3	28,3±1	30,5±1
BAT (mg)/P (g)	3,9±0,02	2,8±0,6	4,3±0,4	3,7±0,4	4,1±0,7	3,0±0,1	4,7±0,5	3,4±0,5
WAT (mg)/P (g)	10,5±0,8	11±0,6	12,2±2,7	17±0,2	14,7±2	17,5±1	22±4	27±1
Glucosa (mg/dL)	80,5±6,5	79±13	83±4	104±15	110,9±12	106±4	117±1	101±11
Insulina (ng/dL)	0,24±0,003	0,3±0,1	0,25±0,02	0,32±0,02	0,26±0,02	0,35±0,04	0,24±0,02	0,3±0,01
Colesterol (mg/dL)	79,1±13	461±39*	109,4±8,4*	565,3±48,8*	122,05±12*	569,8±18*	120 ± 5*	603,9±31**
Triglicéridos (mg/dL)	43,4±1,6	53,9±25*	36,6±5	56,9±8*	62,3±12	73,2±5*	57,2 ± 8	110 ± 12**

WD: dieta tipo *Western*; P: peso corporal; BAT: tejido adiposo marrón; WAT: tejido adiposo blanco. *p<0,05, **p<0,005 vs. cada control.

En primer lugar, estudiamos mediante qRT-PCR la expresión del mRNA de ambas isoformas del IR y del IGF-IR en la arteria aorta de los ratones ApoE^{-/-} a las diferentes edades de estudio (Figura 4.30). Encontramos un incremento significativo de los niveles del mRNA de la isoforma IRA y del IGF-IR en el grupo ApoE^{-/-} de 24 semanas de edad, mientras que dichos niveles estaban disminuidos a las 8, 12 y 18 semanas de edad respecto a los ratones Control (Figura 4.30, A y C). Sin embargo, la expresión de la isoforma IRB era menor en la aorta del modelo ApoE^{-/-} en comparación con los ratones Control a todas las semanas de estudio (Figura 4.30, B).

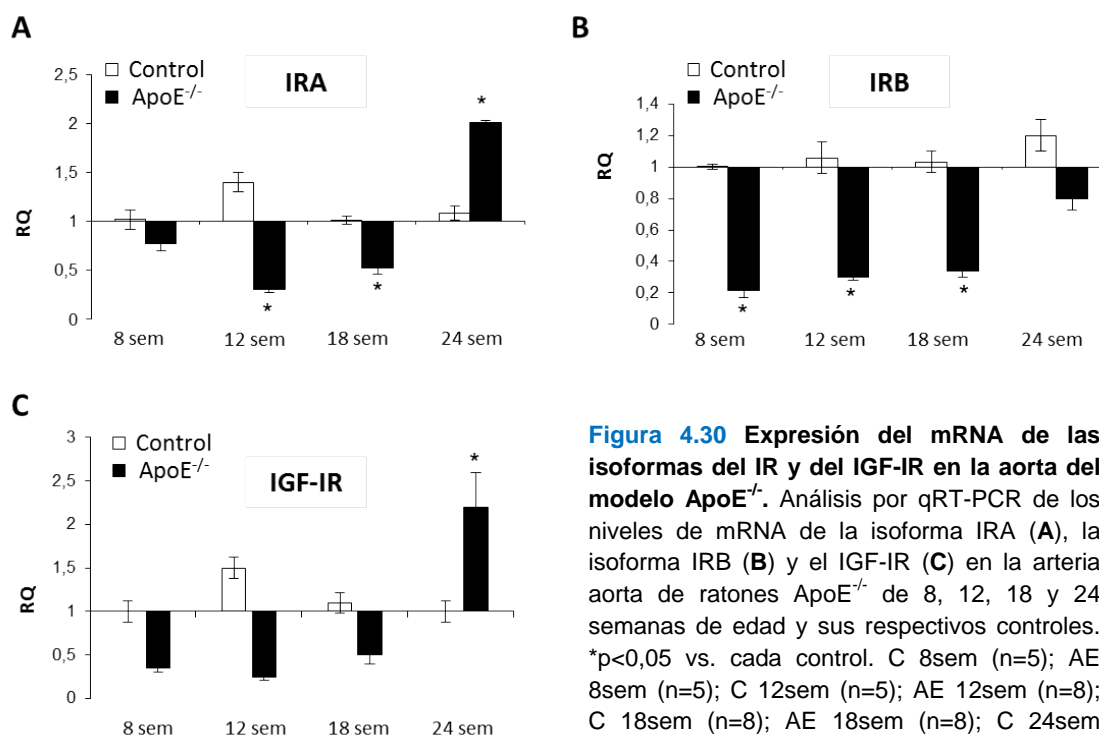


Figura 4.30 Expresión del mRNA de las isoformas del IR y del IGF-IR en la aorta del modelo ApoE^{-/-}. Análisis por qRT-PCR de los niveles de mRNA de la isoforma IRA (A), la isoforma IRB (B) y el IGF-IR (C) en la arteria aorta de ratones ApoE^{-/-} de 8, 12, 18 y 24 semanas de edad y sus respectivos controles. *p<0,05 vs. cada control. C 8sem (n=5); AE 8sem (n=5); C 12sem (n=5); AE 12sem (n=8); C 18sem (n=8); AE 18sem (n=8); C 24sem (n=8); AE 24sem (n=8).

Se ha descrito que el modelo $\text{ApoE}^{-/-}$ entre las 15 y 20 semanas de edad puede presentar lesiones ateroscleróticas con una cápsula fibrosa en la que la presencia de VSMCs indicaría su migración desde la media (Nakashima *et al.*, 1994). Por ello y ante los resultados anteriores en los que el aumento de la IRA y el IGF-IR en la aorta del modelo $\text{ApoE}^{-/-}$ se limitaba a la edad de 24 semanas (**Figura 4.30**), decidimos llevar a cabo los siguientes estudios únicamente y de forma comparativa en los ratones $\text{ApoE}^{-/-}$ de 8 y 24 semanas de edad, así como en sus respectivos controles. Primero caracterizamos las lesiones ateroscleróticas mediante la tinción con Oil Red O de los arcos aórticos, observando un progresivo aumento del área de lesión y del contenido lipídico en el grupo $\text{ApoE}^{-/-}$ de 24 semanas en comparación con los ratones $\text{ApoE}^{-/-}$ de 8 semanas de edad (**Figura 4.31**).

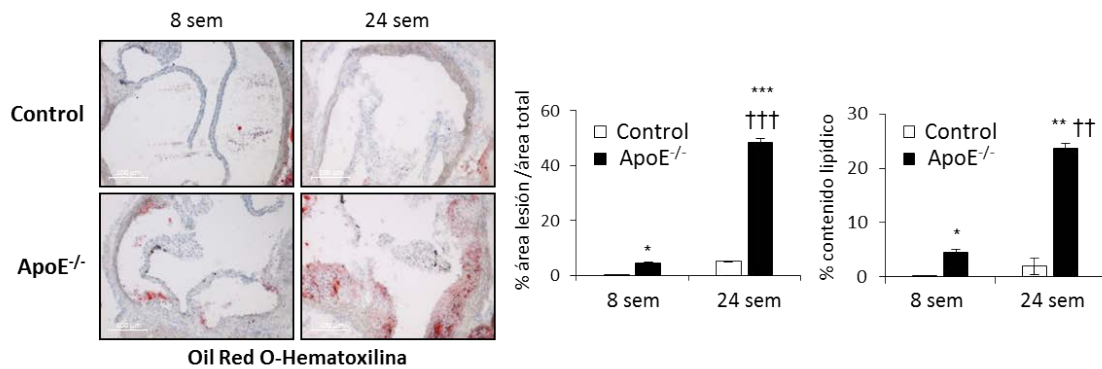


Figura 4.31 Caracterización de las lesiones ateroscleróticas en el modelo $\text{ApoE}^{-/-}$. Fotomicrográficas (aumento 10x) representativas de arcos aórticos teñidos con Oil Red O y contrastados con hematoxilina (izquierda) y cuantificación del área de lesión y la acumulación lipídica (derecha) de ratones $\text{ApoE}^{-/-}$ de 8 y 24 semanas de edad y sus respectivos controles. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$ vs. cada control; †† $p < 0,005$, ††† $p < 0,001$ vs. $\text{ApoE}^{-/-}$ 8sem. C 8sem (n=5); AE 8sem (n=5); C 24sem (n=8); AE 24sem (n=8).

A continuación analizamos mediante inmunohistoquímica los niveles proteicos del IR y del IGF-IR en el arco aórtico del modelo $\text{ApoE}^{-/-}$ de 8 y 24 semanas de edad y sus respectivos controles (**Figura 4.32**). La expresión del IR estaba significativamente disminuida en el arco aórtico de los ratones $\text{ApoE}^{-/-}$ de 8 semanas respecto a los ratones Control de la misma edad (**Figura 4.32, A**), lo que puede relacionarse consistentemente con la reducción del mRNA de las dos isoformas del IR en la aorta de los ratones $\text{ApoE}^{-/-}$ de 8 semanas de edad (**Figura 4.30, A y B**). En el arco aórtico de los ratones $\text{ApoE}^{-/-}$ de 24 semanas los niveles proteicos del IR total eran similares a los de sus controles de la misma edad (**Figura 4.32, A**), hecho que parece coherente con la expresión del mRNA de ambas isoformas, que encontramos aumentada en el caso de la isoforma IRA y disminuida en el caso de la IRB (**Figura 4.30, A y B**). Además del incremento del IGF-IR observado a nivel de su mRNA (**Figura 4.30, C**), también encontramos significativamente aumentados los niveles proteicos de este receptor en el arco aórtico del grupo $\text{ApoE}^{-/-}$ de 24 semanas en comparación con los ratones Control de la misma edad, así como con los ratones $\text{ApoE}^{-/-}$ de 8 semanas (**Figura 4.32, B**). Sin embargo, las lesiones ateroscleróticas estudiadas pueden presentar, además de VSMCs, células inflamatorias que podrían ser también responsables de la expresión del IR y del IGF-IR en las mismas.

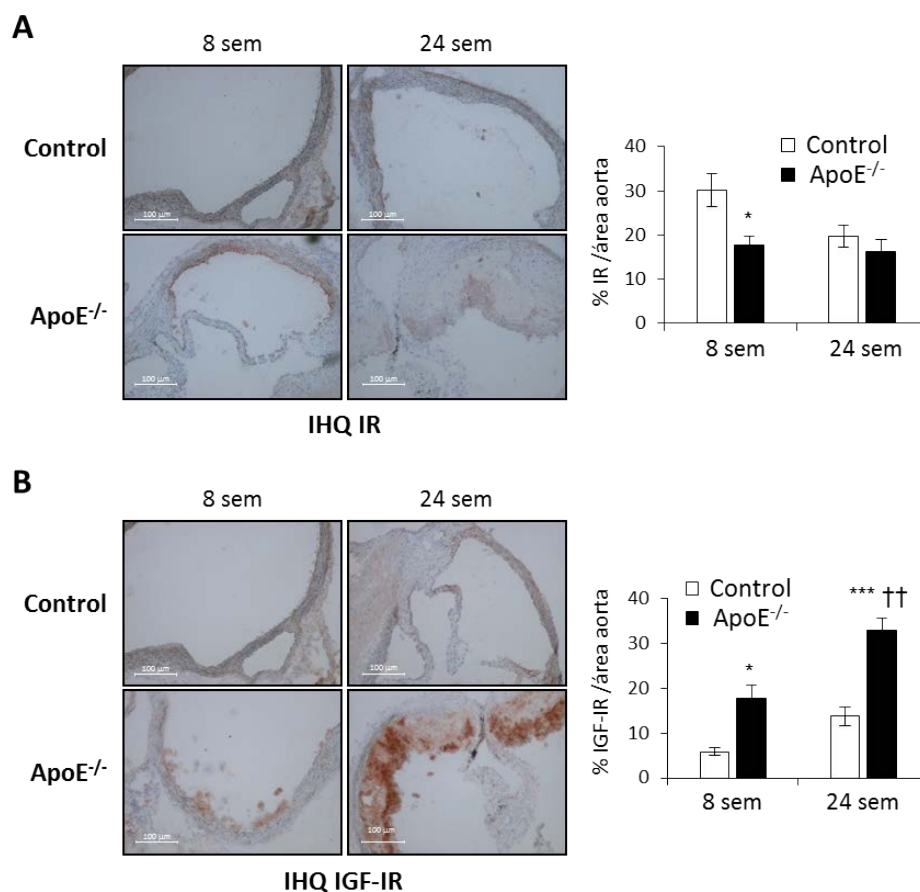


Figura 4.32 Expresión proteica del IR y del IGF-IR en el arco aórtico del modelo ApoE^{-/-}. Fotomicrografías (aumento 10x) representativas (izquierda) y cuantificación (derecha) de la inmunohistoquímica frente al IR (**A**) o al IGF-IR (**B**) en arcos aórticos de ratones ApoE^{-/-} de 8 y 24 semanas de edad y sus respectivos controles. *p<0,05, ***p<0,001 vs. cada control; ††p<0,005 vs. ApoE^{-/-} 8sem. C 8sem (n=5); AE 8sem (n=5); C 24sem (n=8); AE 24sem (n=8).

Con la finalidad de localizar las VSMCs en el arco aórtico del modelo experimental, estudiamos por inmunofluorescencia la proteína α -actina de músculo liso (α -SMA), un conocido marcador de células de músculo liso. Los niveles de α -SMA resultaron ser muy similares en el arco aórtico de los ratones ApoE^{-/-} de 8 y 24 semanas de edad en comparación con sus respectivos controles (**Figura 4.33, A**). Observamos también la presencia de VSMCs en la íntima de las placas fibrosas de los ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas (flechas blancas de la **Figura 4.33, A**), lo que indicaría su migración desde la media. Además, mediante una doble inmunofluorescencia frente al IR o el IGF-IR y frente a la α -SMA (**Figura 4.33, B**), encontramos que estas VSMCs presentes en las placas fibrosas del ratón ApoE^{-/-} de 24 semanas expresan el IR o el IGF-IR (flechas blancas de la **Figura 4.33, B**).

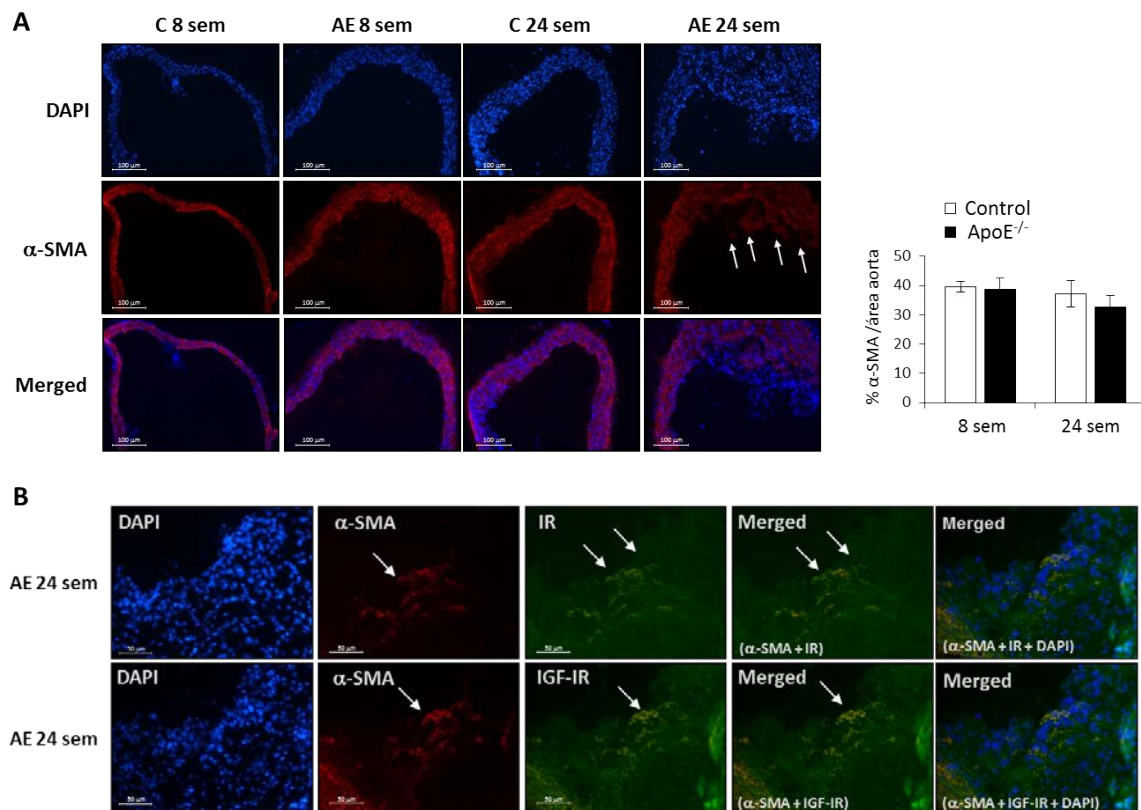


Figura 4.33 Migración y expresión del IR y el IGF-IR por las VSMCs en la íntima de placas ateroscleróticas del modelo ApoE^{-/-}. (A) Fotomicrografías (aumento 10x) representativas (izquierda) y cuantificación (derecha) de la inmunofluorescencia frente a α -SMA en arcos aórticos de ratones ApoE^{-/-} de 8 y 24 semanas de edad y sus respectivos controles. (B) Fotomicrografías (aumento 20x) representativas de la inmunofluorescencia doble frente al IR o el IGF-IR (verde) y frente a la α -SMA (rojo) en arcos aórticos de ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas de edad. El marcaje con DAPI se empleó para la visualización de los núcleos celulares (azul). AE: ApoE^{-/-}; C: Control. C 8sem (n=5); AE 8sem (n=5); C 24sem (n=8); AE 24sem (n=8).

4.2.6 Expresión del mRNA de las isoformas del IR, el IGF-IR y los IGFs en la capa media de aortas humanas

Basándonos en los resultados *in vitro* e *in vivo* obtenidos en esta parte de la tesis y en aquellos derivados de dos modelos experimentales con daño vascular, ApoE^{-/-} y BATIRKO, previamente publicados (Gómez-Hernández *et al.*, 2013), nos planteamos si las isoformas del IR y el IGF-IR podrían jugar un papel relevante en las etapas tempranas de la aterosclerosis humana. Con este objetivo, analizamos mediante qRT-PCR la expresión del mRNA del IR total, de cada isoforma IRA e IRB, del IGF-IR y de los IGFs en la capa media de arterias aortas humanas (**Figura 4.34**). De un total de 28 muestras aórticas humanas, 8 carecían de signos de lesión visibles macroscópicamente y fueron clasificadas como aortas sanas, mientras que el resto mostraban características de lesiones ateromatosas tempranas, incluyendo 9 con lesiones de tipo estría grasa y 11 con lesiones fibrolipídicas. La expresión del IR total era significativamente menor en la media de las aortas con lesiones fibrolipídicas en comparación con las aortas sanas. Cuando analizamos específicamente los niveles del mRNA de la isoforma

IRA encontramos un notable incremento de los mismos en la capa media de las aortas con lesiones tanto de tipo estría grasa como fibrolipídicas respecto a las aortas sanas, mientras que no observamos cambios significativos en la expresión de la isoforma IRB. También destacable fue el aumento significativo encontrado en la expresión génica del IGF-I y su receptor, el IGF-IR, en la capa media de las aortas que contenían estrías grasas cuando se compararon con las aortas sanas y con lesiones fibrolipídicas. De forma similar, la expresión del IGF-II resultó marcadamente mayor en la media de las muestras aórticas con estrías grasas que en las sanas o con ateromas fibrolipídicos. Estos resultados sugieren que el incremento en la expresión de la isoforma IRA, el IGF-IR y los IGFs en la capa media, principalmente compuesta por VSMCs, puede favorecer la migración de estas células hacia la íntima.

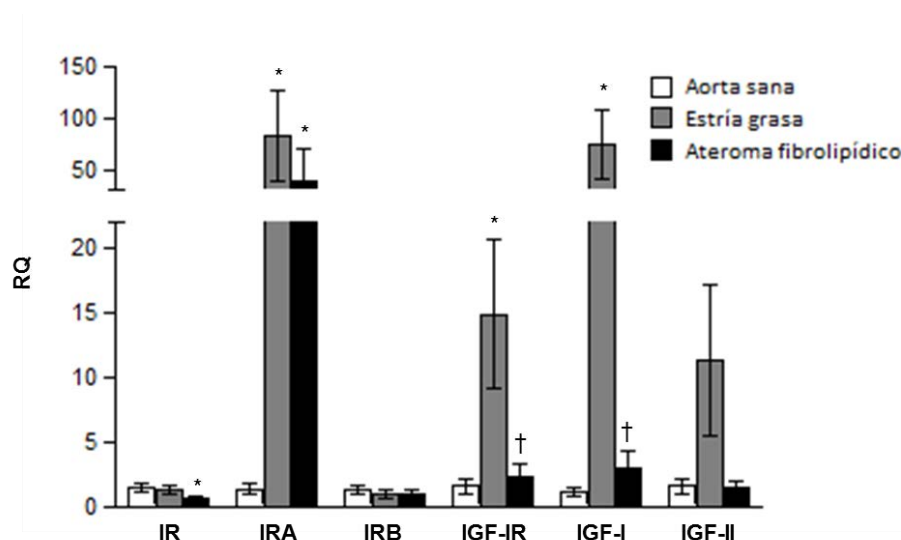


Figura 4.34 Expresión del mRNA de las isoformas del IR, el IGF-IR y los IGFs en la capa media de aortas humanas. Análisis por qRT-PCR de los niveles del mRNA del IR total, las isoformas IRA e IRB, el IGF-IR y los IGFs en la capa media de 28 muestras aórticas humanas (8 aortas sanas, 9 con estrías grasas y 11 con lesiones fibrolipídicas). * $p < 0,05$ vs. aorta sana; † $p < 0,05$ vs. estría grasa.

4.3 El papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y el IGF-IIR en las fases avanzadas del proceso aterosclerótico

En las fases avanzadas del proceso aterosclerótico existe un alto riesgo de que se produzcan eventos cardiovasculares agudos como resultado de la rotura o erosión de la placa. Estas lesiones ateroscleróticas presentan, generalmente, un bajo contenido en VSMCs y un elevado número de células inflamatorias, así como una incrementada apoptosis de las VSMCs y los macrófagos (Littlewood y Bennett, 2003). Se ha descrito que el IGF-I y su receptor, el IGF-IR, previenen la inestabilidad de las placas ateroscleróticas por sus efectos mitogénicos y antiapoptóticos sobre las VSMCs (von der Thüsen *et al.*, 2011). Sin embargo, el papel que las isoformas del IR o el IGF-IIR podrían tener en la apoptosis de las VSMCs durante la aterogénesis avanzada continuaba siendo desconocido. Por esta razón, en esta última parte de la tesis quisimos abordar el estudio de las isoformas del IR y los receptores de IGFs (IGF-IR e IGF-IIR) en las etapas avanzadas de la aterosclerosis experimental y humana y, concretamente, su contribución a la apoptosis de las VSMCs.

4.3.1 Expresión de las isoformas del IR y los receptores de IGFs en placas complicadas y no complicadas de pacientes con aterosclerosis carotídea

En primer lugar, estudiamos la expresión de las isoformas del IR (IRA e IRB), del IGF-IR y del IGF-IIR, así como de sus ligandos, IGF-I e IGF-II, en placas ateroscleróticas humanas. Para ello, utilizamos muestras de placas ateroscleróticas procedentes de 59 pacientes que habían sido sometidos a una endarterectomía carotídea. Las muestras recogidas fueron diseccionadas separando la zona complicada estenosante de la placa adyacente menos avanzada. Mediante el estudio histológico de secciones de las placas ateroscleróticas teñidas con tricrómico de Masson se comprobó que las placas complicadas presentaban fisuras, hemorragias y/o cierto grado de calcificación, así como una cantidad relativamente importante de células inflamatorias, principalmente localizadas en la región de los hombros, a ambos lados del núcleo lipídico o ateroma. Las regiones adyacentes, consideradas placas no complicadas, se caracterizaban por la presencia de engrosamientos fibrosos de la íntima (**Figura 4.35**).

Analizamos mediante inmunohistoquímica la expresión del IR, IGF-IR, IGF-IIR, IGF-I e IGF-II comparativamente en las distintas regiones de placas ateroscleróticas humanas complicadas y no complicadas (**Figura 4.36**). La expresión del IR y del IGF-II era significativamente menor en la región fibrosa en comparación con la capa media de las placas complicadas y no complicadas. Asimismo, en las placas complicadas encontramos un aumento significativo de la expresión de los tres receptores estudiados, así como del IGF-I, en la región de los hombros en comparación tanto con la capa media como con la región fibrosa. En el caso del IGF-II, su expresión en la región de los hombros estaba aumentada significativamente con respecto a la región fibrosa.

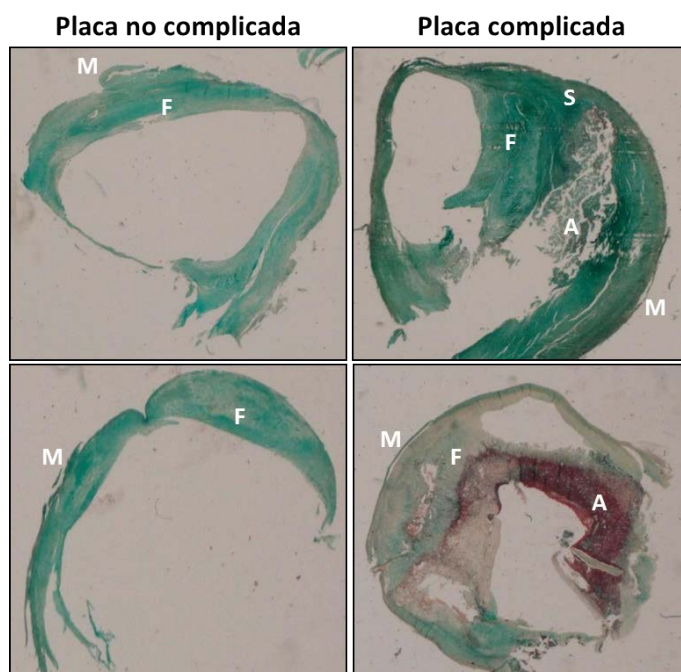


Figura 4.35 Estudio histológico de placas ateroscleróticas humanas. Imágenes representativas de secciones de placas de aterosclerosis carotídea teñidas con tricrómico de Masson para su clasificación en placas no complicadas y placas complicadas. Se muestran diferentes áreas de la placa: M: capa media, F: región fibrosa, A: ateroma y S: región de los hombros (en inglés, *shoulder*).

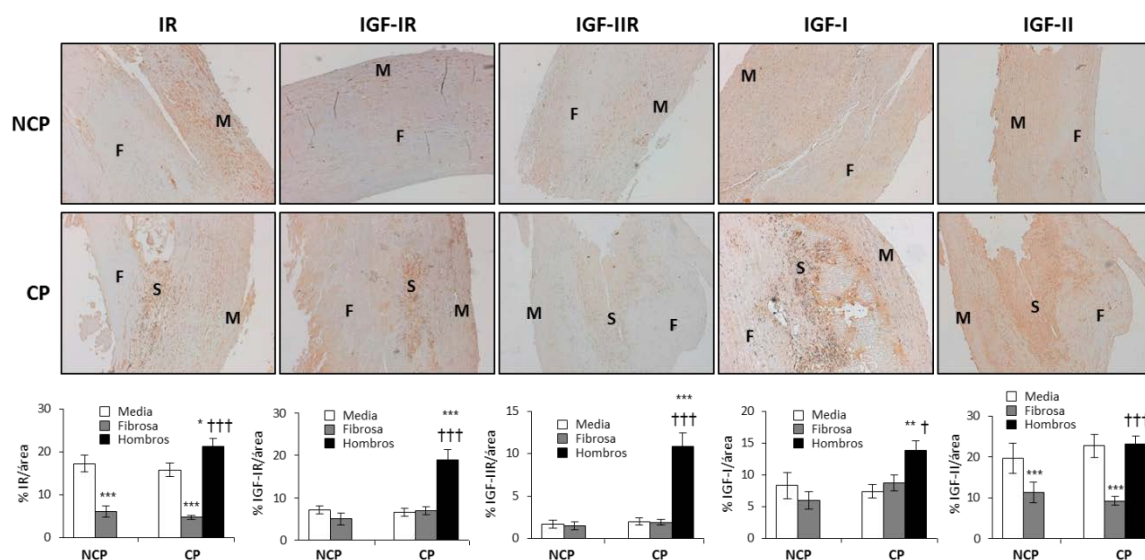


Figura 4.36 Expresión del IR, IGF-IR, IGF-IIR, IGF-I e IGF-II en placas ateroscleróticas humanas. Fotomicrografías (aumento 10x) representativas y cuantificación de la inmunohistoquímica frente al IR, IGF-IR, IGF-IIR, IGF-I e IGF-II en placas de aterosclerosis carotídea complicadas (n=59) y no complicadas (n=24). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ vs. media; † $p < 0,05$, ††† $p < 0,0005$ vs. región fibrosa. NCP: placa no complicada; CP: placa complicada; M: capa media; F: región fibrosa; S: región de los hombros.

Para estudiar de forma diferencial la expresión de las isoformas del IR en las placas ateroscleróticas humanas llevamos a cabo inmunoprecipitaciones seriadas utilizando, en primer lugar, un anticuerpo capaz de reconocer específicamente la isoforma IRB (anticuerpo IRB, proporcionado por el Dr. Sesti y la Dra. Hribal) y, seguidamente, otro que reconoce ambas isoformas del IR (anticuerpo IR β), tal y como habíamos descrito previamente (Gómez-Hernández *et al.*, 2013). El anticuerpo IRB fue generado por Sesti y colaboradores para reconocer específicamente el exón 11 del IR y, por tanto, la isoforma IRB y no la IRA al carecer esta última de dicho exón (Sesti *et al.*, 1994). Los extractos proteicos totales (150 μ g) precedentes de placas ateroscleróticas complicadas y no complicadas se emplearon para inmunoprecipitar la isoforma IRB y su expresión fue analizada mediante *Western blot* frente al anticuerpo IRB. Los sobrenadantes recogidos de la primera inmunoprecipitación, en los que la única isoforma presente era la IRA, fueron utilizados para inmunoprecipitar dicha isoforma y evaluar su expresión mediante *Western blot* frente al anticuerpo IR β (**Figura 4.37**). De esta forma, encontramos que la expresión de la isoforma IRA en las placas complicadas estaba significativamente disminuida, mientras que la isoforma IRB estaba aumentando, en comparación con las placas no complicadas.

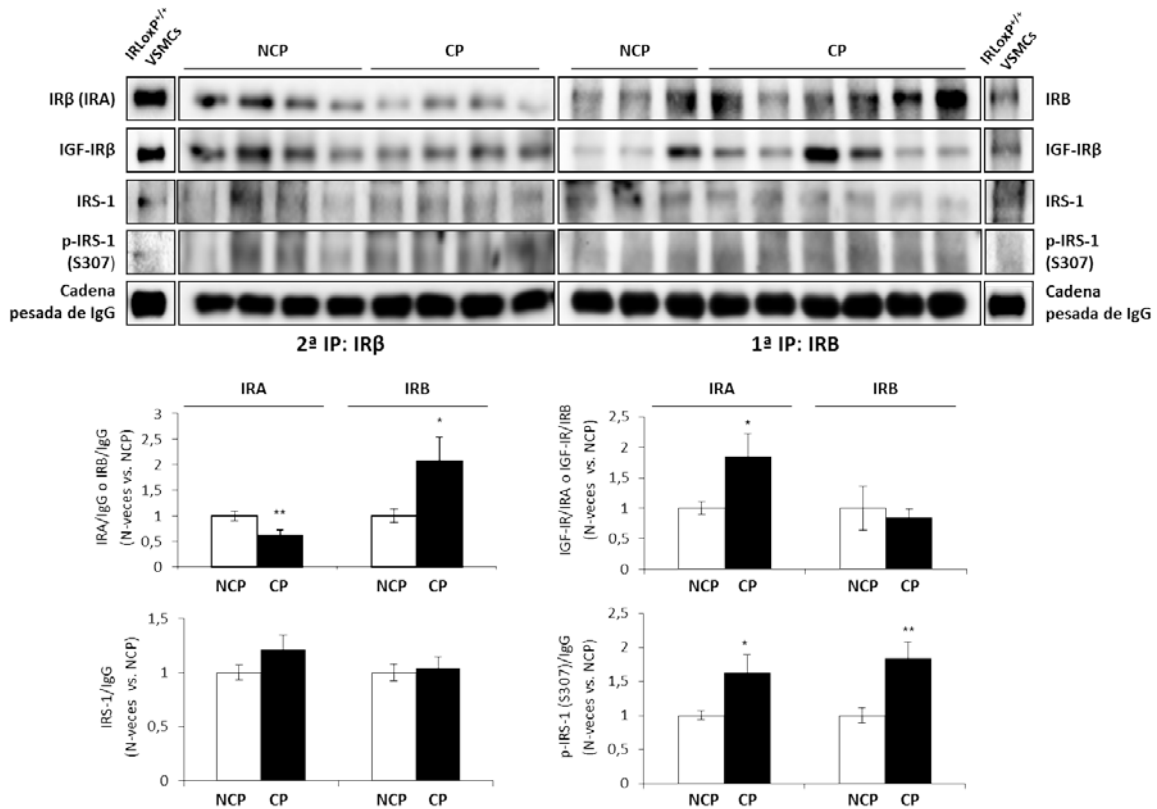


Figura 4.37 Expresión de las isoformas del IR y su asociación con el IGF-IR y con el IRS-1 en placas ateroscleróticas humanas complicadas y no complicadas. Inmunoprecipitaciones seriadas, primero, de la isoforma IRB (panel derecho) y, segundo, del IR β (isoforma IRA) (panel izquierdo), seguidas de *Western blot* frente al IRB y al IR β , respectivamente, y frente a IGF-IR, al IRS-1 y al p-IRS-1 (Ser307), y sus respectivas cuantificaciones, en placas de aterosclerosis carotídea complicadas (n=10) y no complicadas (n=10). La línea celular IRLoxP^{+/+} VSMCs, que expresa ambas isoformas del IR, se empleó como control de las inmunoprecipitaciones. *p<0,05, **p<0,005 vs. NCP. NCP: placa no complicada; CP: placa complicada; IP: inmunoprecipitación.

A continuación, estudiamos mediante *Western blot* la asociación de cada una de las isoformas del IR inmunoprecipitadas con el IGF-IR o con el IRS-1, en su forma total y fosforilada en la serina 307 (**Figura 4.37**). Observamos un incremento significativo de los receptores híbridos IRA/IGF-IR en las placas complicadas respecto a las no complicadas, mientras que no se encontraron diferencias en la expresión de los receptores híbridos IRB/IGF-IR entre placas complicadas y no complicadas. En cuanto al IRS-1, su asociación con la isoforma IRA o con la IRB no mostraba cambios significativos en las placas complicadas en relación a las no complicadas. Sin embargo, la fosforilación del IRS-1, unido tanto a la isoforma IRA como a la IRB, en el residuo de serina 307, que se ha relacionado con la resistencia a la insulina inducida por citoquinas proinflamatorias como el TNF- α (Aguirre *et al.*, 2000), era significativamente mayor en las placas complicadas que en las no complicadas.

Para valorar los niveles proteicos del IGF-IR en las placas ateroscleróticas complicadas y no complicadas utilizamos los sobrenadantes de la segunda inmunoprecipitación, en los que dicho receptor se encontraría en forma de homodímeros, pues el IGF-IR formando parte de los recetores híbridos habría sido previamente inmunoprecipitado junto con el IR. Medimos, además, los niveles del IGF-IIR en los mismos sobrenadantes (**Figura 4.38**). Así, la expresión del IGF-IR estaba significativamente disminuida en las placas complicadas; por el contrario, encontramos un incremento significativo de los niveles proteicos del IGF-IIR en las placas complicadas en relación a las placas no complicadas.

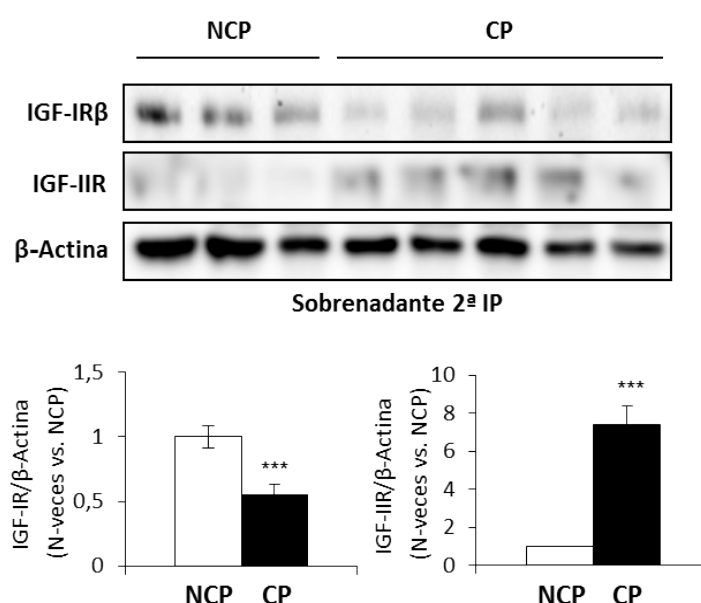


Figura 4.38 Expresión del IGF-IR y del IGF-IIR en placas ateroscleróticas humanas complicadas y no complicadas. Geles representativos y cuantificación de la expresión del IGF-IR y del IGF-IIR analizada mediante *Western blot* en los sobrenadantes de las inmunoprecipitaciones seriadas (IRB e IRA) de placas de aterosclerosis carotídea complicadas (n=10) y no complicadas (n=10). ***p<0,0005 vs. NCP. NCP: placa no complicada; CP: placa complicada; IP: inmunoprecipitación.

4.3.2 Las placas complicadas de pacientes con aterosclerosis carotídea presentan un menor número de células de músculo liso vascular

En la aterosclerosis avanzada la pérdida de VSMCs, como resultado de un aumento de su apoptosis, puede ser un evento clave en la rotura de la placa y sus consecuencias clínicas (Bennett *et al.*, 2016). Por ello, estudiamos el contenido en VSMCs de placas complicadas de pacientes con aterosclerosis carotídea, comparativamente con placas no complicadas. Mediante *Western blot* observamos que la expresión de la α -SMA era significativamente menor en las placas complicadas, indicando una menor cantidad de VSMCs en las mismas (**Figura 4.39**).

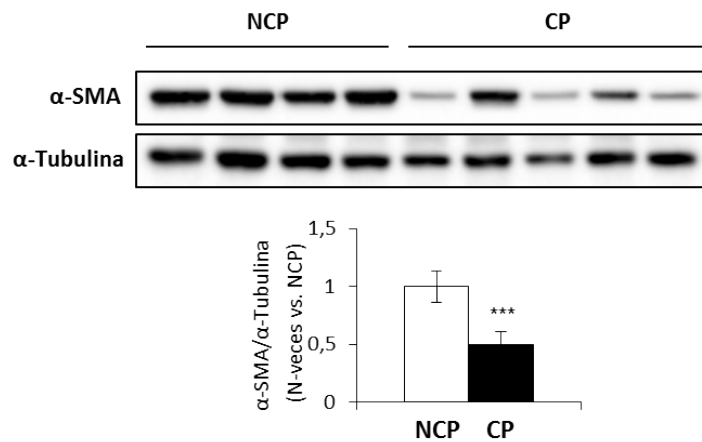


Figura 4.39 Expresión de la α -SMA en placas ateroscleróticas humanas complicadas y no complicadas. Geles representativos y cuantificación de la expresión de la α -SMA analizada mediante *Western blot* en placas de aterosclerosis carotídea complicadas (n=10) y no complicadas (n=10). *** $p < 0,0005$ vs. NCP. NCP: placa no complicada; CP: placa complicada.

4.3.3 Expresión de las isoformas del IR y los receptores de IGFs en modelos experimentales de aterosclerosis

Con la finalidad de estudiar el papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y el IGF-IIR en las etapas avanzadas de la aterosclerosis experimental utilizamos distintos modelos animales que desarrollaban lesiones ateroscleróticas de diferente gravedad. Como primera aproximación, empleamos el modelo BATIRKO; ApoE^{-/-} de 24 semanas de edad sometido a dieta tipo *Western* (21 % de kcal aportadas por la grasa) que, como se ha descrito anteriormente, presentaba un mayor daño vascular que los ratones Control WD y ApoE^{-/-} WD de 24 semanas (**Figura 4.13, A**). En primer lugar, analizamos mediante inmunohistoquímica los niveles proteicos del IR en el arco aórtico de los tres grupos de animales, sin encontrar diferencias significativas entre ellos (**Figura 4.40, A**). Sin embargo, al evaluar su expresión diferenciando la capa media de la íntima, observamos que el IR estaba disminuido significativamente en la media del arco aórtico de los grupos ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-} en comparación con los

ratones Control, y que era ligeramente superior en la íntima de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} que en aquella de los ApoE^{-/-} (Figura 4.40, A). La expresión del mRNA de las isoformas del IR fue analizada, a continuación, mediante qRT-PCR en la aorta de los tres grupos de animales estudiados (Figura 4.40, B). Así, la expresión génica de la isoforma IRA aparecía significativamente disminuida, mientras que la isoforma IRB estaba incrementada, en la aorta del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas de edad. Este perfil de expresión de las isoformas del IR en el ratón BATIRKO; ApoE^{-/-}, con disminución del ratio IRA/IRB, es similar al observado en placas ateroscleróticas humanas complicadas (Figura 4.37).

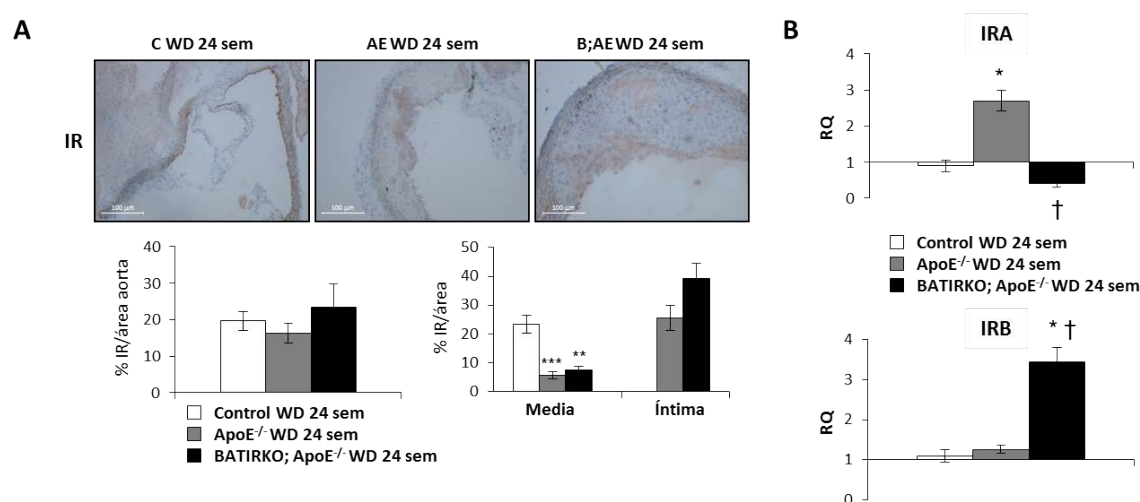


Figura 4.40 Expresión del IR en la aorta del modelo experimental de 24 semanas. (A) Fotomicrografías (aumento 10x) representativas y cuantificación de la inmunohistoquímica frente al IR en arcos aórticos de ratones Control WD, ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas de edad. (B) Análisis por qRT-PCR de los niveles de mRNA de las isoformas IRA e IRB en la aorta de ratones Control WD, ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas de edad. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005 vs. Control WD 24 sem; †p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD 24 sem. AE: ApoE^{-/-}; B;AE: BATIRKO; ApoE^{-/-}; C: Control; WD: dieta tipo Western.

Seguidamente analizamos la expresión del IGF-IR a nivel proteico y de mRNA en la aorta de los tres grupos de animales estudiados (Figura 4.41). Mediante inmunohistoquímica observamos un incremento significativo de los niveles proteicos del IGF-IR en el arco aórtico de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD en comparación con los grupos ApoE^{-/-} WD y Control WD de 24 semanas de edad (Figura 4.41, A). Dicho incremento del IGF-IR se debía principalmente a su expresión en la íntima, ya que el receptor estaba significativamente disminuido en la capa media del arco aórtico de los ratones ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-} respecto a los ratones Control. De forma coherente con estos datos, la expresión del mRNA del IGF-IR estaba aumentada significativamente en la aorta del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas en comparación con los otros dos grupos de animales (Figura 4.41, B). Por último, la expresión del IGF-IIR fue analizada mediante inmunohistoquímica en los grupos Control WD, ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas de edad y,

4. Resultados

aunque no se encontraron diferencias significativas, el IGF-IIR parecía estar levemente aumentado en el arco aórtico del grupo BATIRKO; ApoE^{-/-} (Figura 4.42).

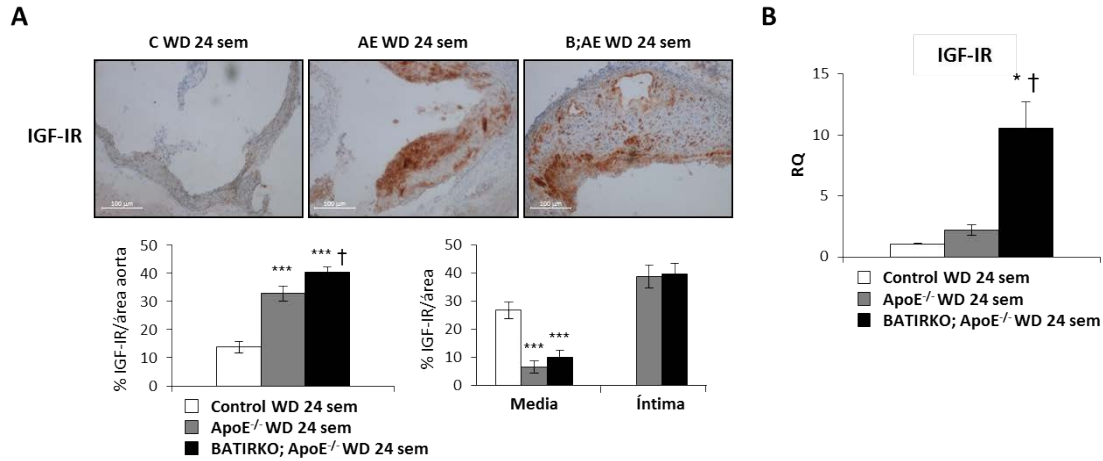


Figura 4.41 Expresión del IGF-IR en la aorta del modelo experimental de 24 semanas. (A) Fotomicrografías (aumento 10x) representativas y cuantificación de la inmunohistoquímica frente al IGF-IR en arcos aórticos de ratones Control WD, ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas de edad. (B) Análisis por qRT-PCR de los niveles de mRNA del IGF-IR en la aorta de ratones Control WD, ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas de edad. *p<0,05, ***p<0,0005 vs. Control WD 24 sem; †p<0,05 vs. ApoE^{-/-} WD 24 sem. AE: ApoE^{-/-}; B;AE: BATIRKO; ApoE^{-/-}; C: Control; WD: dieta tipo *Western*.

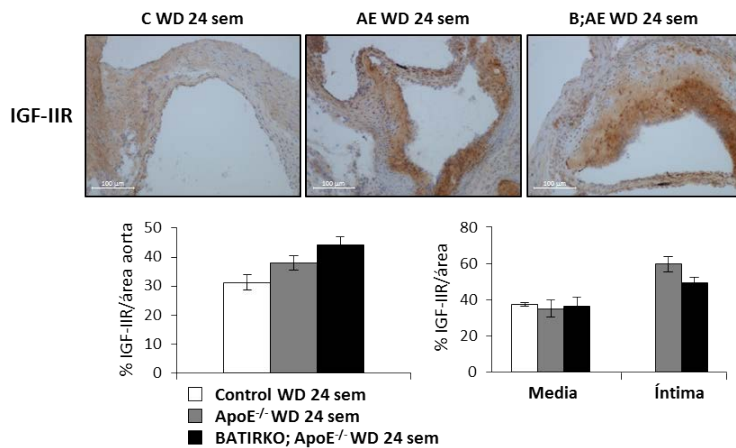


Figura 4.42 Expresión del IGF-IIIR en el arco aórtico del modelo experimental de 24 semanas. Fotomicrografías (aumento 10x) representativas y cuantificación de la inmunohistoquímica frente al IGFII-R en arcos aórticos de ratones Control WD, ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas de edad. AE: ApoE^{-/-}; B;AE: BATIRKO; ApoE^{-/-}; C: Control; WD: dieta tipo *Western*.

Es conocido que el modelo ApoE^{-/-} desarrolla el espectro completo de lesiones que tiene lugar durante la aterogénesis, proceso que, aunque se ve acelerado por una dieta rica en grasa, ocurre también de forma espontánea cuando los animales son alimentados con dieta normal (Nakashima *et al.*, 1994). En base a esto, en una segunda aproximación para estudiar la aterosclerosis experimental en fase avanzada, se emplearon ratones ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-} que fueron alimentados con una dieta estándar hasta el momento del sacrificio a los 15 meses de edad. Los niveles proteicos del IR y del IGF-IR se analizaron mediante inmunohistoquímica en el arco aórtico de ambos grupos de animales, así como de los ratones Control de la misma edad. De forma similar a lo observado en el modelo de 24 semanas con dieta tipo *Western*, no encontramos diferencias importantes en los niveles del IR entre los arcos aórticos de los distintos grupos estudiados, aunque en la capa media de los mismos el IR estaba disminuido significativamente en los ratones ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-} en comparación con los ratones Control (Figura 4.43). Observamos, además, un aumento significativo de la expresión del IGF-IR en el arco aórtico y, mayoritariamente, en la íntima del grupo BATIRKO; ApoE^{-/-} respecto a los ratones ApoE^{-/-} de 15 meses de edad (Figura 4.44).

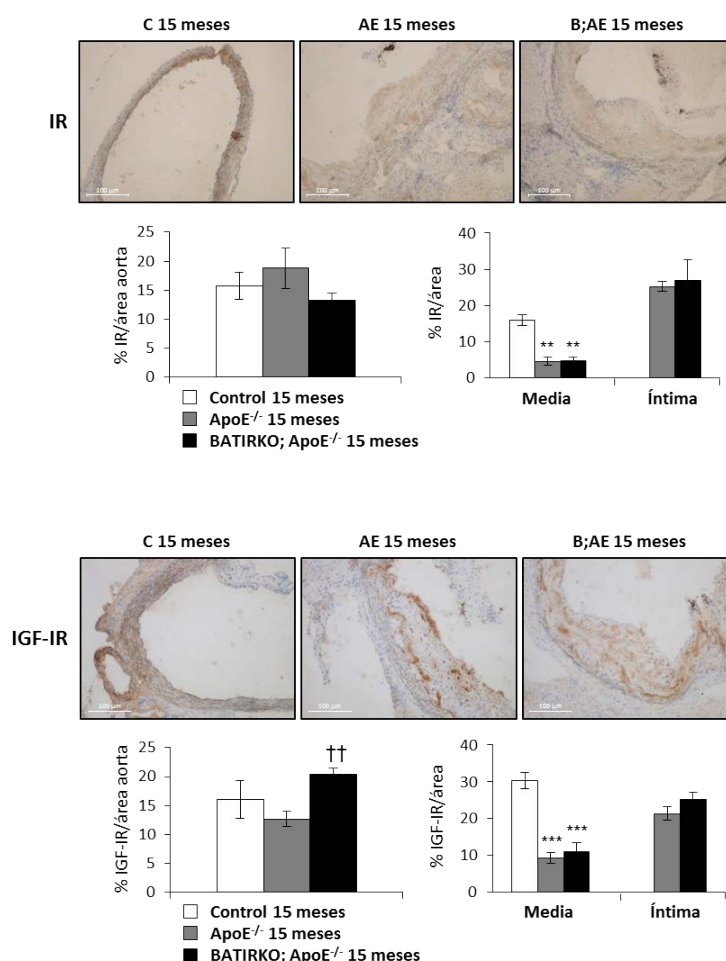


Figura 4.43 Expresión del IR en el arco aórtico del modelo experimental de 15 meses. Fotomicrografías (aumento 10x) representativas y cuantificación de la inmunohistoquímica frente al IR en arcos aórticos de ratones Control, ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-} de 15 meses de edad. **p<0,005 vs. Control 15 meses. AE: ApoE^{-/-}; B;AE: BATIRKO; ApoE^{-/-}; C: Control.

Figura 4.44 Expresión del IGF-IR en el arco aórtico del modelo experimental de 15 meses. Fotomicrografías (aumento 10x) representativas y cuantificación de la inmunohistoquímica frente al IGF-IR en arcos aórticos de ratones Control, ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-} de 15 meses de edad. ***p<0,0005 vs. Control 15 meses; ††p<0,005 vs. ApoE^{-/-} 15 meses. AE: ApoE^{-/-}; B;AE: BATIRKO; ApoE^{-/-}; C: Control.

4.3.4 Las lesiones ateroscleróticas avanzadas de modelos experimentales presentan menor contenido de células de músculo liso vascular y mayor apoptosis

Para evaluar la cantidad de VSMCs presentes en las lesiones ateroscleróticas de los modelos experimentales, analizamos por inmunofluorescencia la expresión de la α -SMA en el arco aórtico de los grupos Control WD, ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas, así como en los grupos Control, ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-} de 15 meses de edad (**Figuras 4.45 y 4.46**). Así, encontramos una importante y significativa reducción de la α -SMA en el arco aórtico de los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas en comparación con los grupos Control WD y ApoE^{-/-} WD de la misma edad (**Figura 4.45**). La expresión de la α -SMA también resultó significativamente menor en el arco aórtico del grupo BATIRKO; ApoE^{-/-} de 15 meses de edad al compararla con la de los ratones Control (**Figura 4.46**). Estos resultados son coherentes con la disminución de la α -SMA observada en placas complicadas de pacientes con aterosclerosis carotídea (**Figura 4.39**) y sugieren que en fases avanzadas tiene lugar una pérdida importante de VSMCs, lo que puede favorecer la inestabilidad de las placas ateroscleróticas.

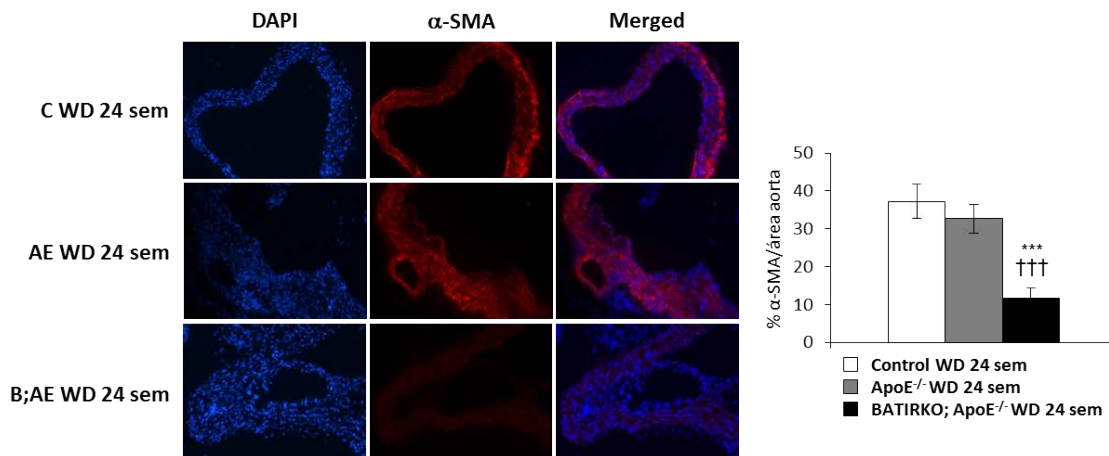


Figura 4.45 Contenido de VSMCs en el arco aórtico del modelo experimental de 24 semanas. Fotomicrografías (aumento 10x) representativas y cuantificación de la inmunofluorescencia frente a la α -SMA en arcos aórticos de ratones Control WD, ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas de edad. ***p<0,0005 vs. Control WD 24 sem; †††p<0,0005 vs. ApoE^{-/-} WD 24 sem. AE: ApoE^{-/-}; B;AE: BATIRKO; ApoE^{-/-}; C: Control; WD: dieta tipo *Western*.

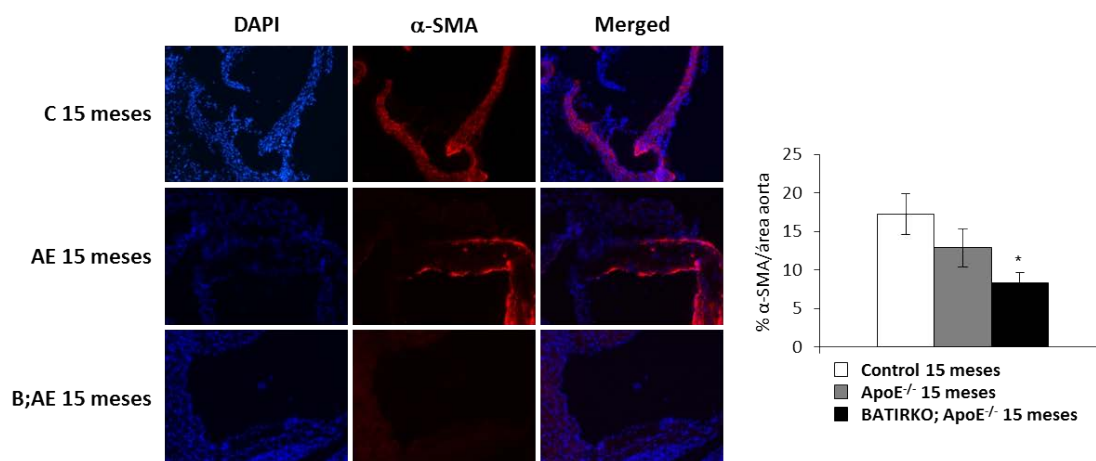


Figura 4.46 Contenido de VSMCs en el arco aórtico del modelo experimental de 15 meses. Fotomicrografías (aumento 10x) representativas y cuantificación de la inmunofluorescencia frente a la α -SMA en arcos aórticos de ratones Control, ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-} de 15 meses de edad. * $p < 0,05$ vs. Control 15 meses. AE: ApoE^{-/-}; B;AE: BATIRKO; ApoE^{-/-}; C: Control.

Dado que la apoptosis es el principal mecanismo responsable de la pérdida de VSMCs durante la aterogénesis (Littlewood y Bennett, 2003), quisimos estudiar su presencia en las placas ateroscleróticas de los distintos modelos animales. Para ello, empleamos como marcador de apoptosis la enzima nuclear poli ADP ribosa polimerasa (PARP), que es activada por rotura proteolítica en respuesta a un daño celular, y analizamos por inmunohistoquímica el número de células apoptóticas presentes en el arco aórtico de los diferentes grupos de animales estudiados (Figuras 4.47 y 4.48). La presencia de células positivas para la PARP activa estaba significativamente aumentada en el arco aórtico de los grupos ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas en comparación con los ratones Control WD de la misma edad (Figura 4.47).

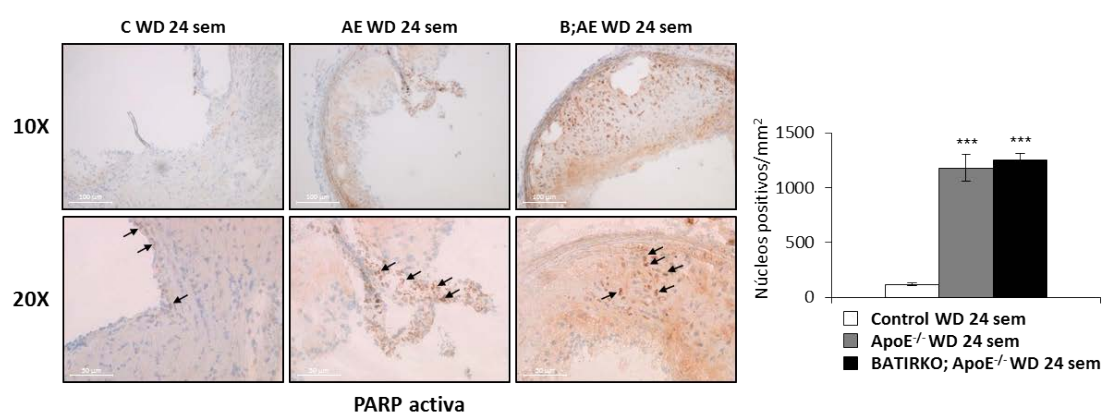


Figura 4.47 Presencia de apoptosis en el arco aórtico del modelo experimental de 24 semanas. Fotomicrografías representativas y cuantificación de la inmunohistoquímica frente a la PARP activa en arcos aórticos de ratones Control WD, ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas de edad. *** $p < 0,0005$ vs. Control WD 24 sem. AE: ApoE^{-/-}; B;AE: BATIRKO; ApoE^{-/-}; C: Control; WD: dieta tipo Western.

Asimismo, en el modelo de 15 meses de edad observamos un incremento significativo del número de células apoptóticas presentes en el arco aórtico de los ratones ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-} respecto a los ratones Control, siendo además significativamente mayor en el arco aórtico del grupo BATIRKO; ApoE^{-/-} que en aquel del grupo ApoE^{-/-} (**Figura 4.48**).

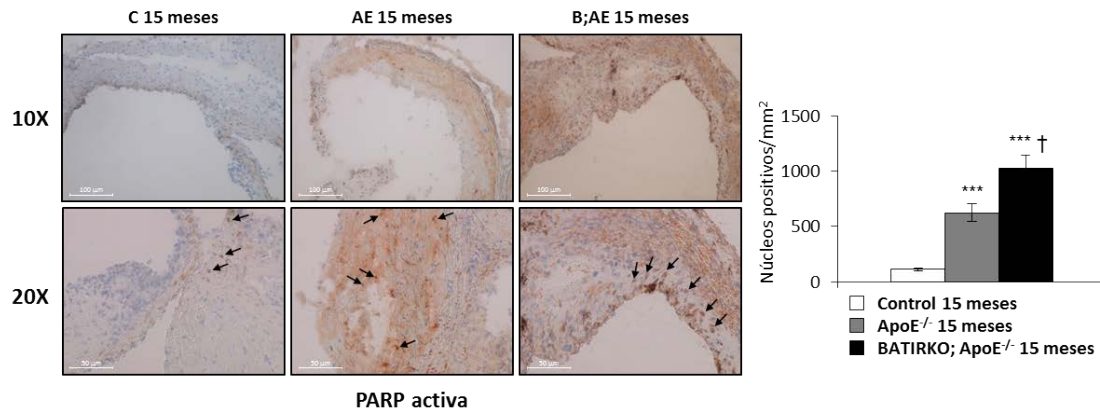


Figura 4.48 Presencia de apoptosis en el arco aórtico del modelo experimental de 15 meses. Fotomicrografías representativas y cuantificación de la inmunohistoquímica frente la PARP activa en arcos aórticos de ratones Control, ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-} de 15 meses de edad. ***p<0,0005 vs. Control 15 meses; †p<0,05 vs. ApoE^{-/-} 15 meses. AE: ApoE^{-/-}; B;AE: BATIRKO; ApoE^{-/-}; C: Control.

4.3.5 El IGF-IR tiene un papel antiapoptótico en las células de músculo liso vascular

En esta tesis hemos demostrado que el IGF-IR juega un papel importante en la migración de las VSMCs contribuyendo al desarrollo de la aterosclerosis durante sus etapas iniciales. Nos planteamos, además, investigar si dicho receptor puede ser también relevante en las fases más avanzadas del proceso aterosclerótico y, concretamente, su implicación en la apoptosis de las VSMCs. Para ello, empleamos las líneas celulares IRLoxP^{+/+} e IR^{-/-} VSMCs y estudiamos el efecto de la inhibición del IGF-IR en la apoptosis de las mismas mediante el análisis por *Western blot* de la activación de la caspasa 3, una proteasa central en la fase ejecutora de la apoptosis celular. Comprobamos, en primer lugar, que la inhibición del IGF-IR por PPP inducía de forma significativa la expresión de la caspasa 3 activa en ambas líneas celulares, siendo este efecto más importante en las IR^{-/-} VSMCs (**Figura 4.49**). Asimismo, cuando las células fueron estimuladas con IGF-I o IGF-II durante 24 horas el tratamiento con PPP incrementó significativamente la activación de la caspasa 3 en las dos líneas de VSMCs estudiadas, y este incremento fue mayor en el caso de la estimulación con IGF-II (**Figura 4.49**). Estos datos indican que la inhibición del IGF-IR, tanto de forma basal como en presencia de los IGFs, promueve la apoptosis de las VSMCs.

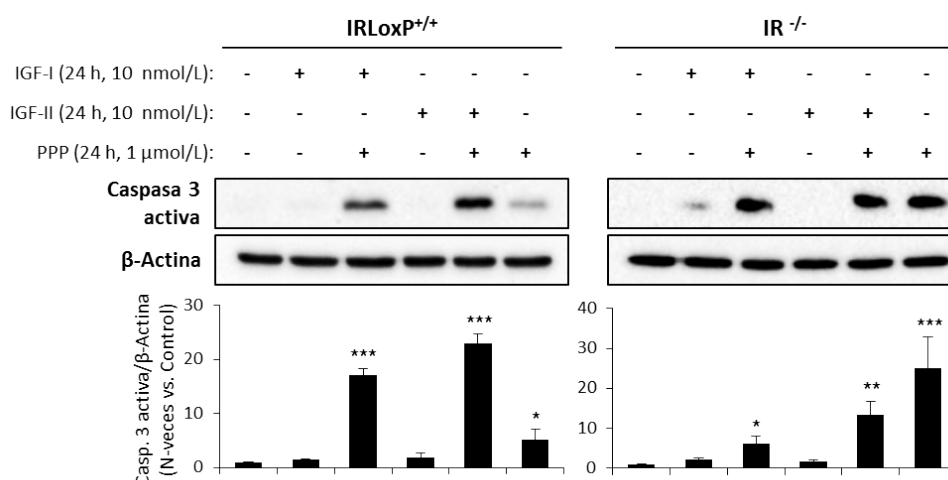


Figura 4.49 Efecto de la inhibición del IGF-IR en la apoptosis de las VSMCs. Efecto de PPP (1 μmol/L) en la activación de la caspasa 3 analizada por *Western blot* en las IRLoxP^{+/+} e IR^{-/-} VSMCs estimuladas con IGF-I (10 nmol/L) o IGF-II (10 nmol/L) durante 24 horas. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. *p<0,05, **p<0,005, ***p<0,0005 vs. cada control.

Continuando con el estudio del IGF-IR en la apoptosis de las VSMCs, las células fueron tratadas con diferentes dosis de taspigargina, un inhibidor no competitivo de la enzima Ca²⁺/ATPasa del retículo endoplásmico que induce estrés en el retículo y conduce, en último término, a la muerte celular. La activación de la caspasa 3 se observó con una dosis de taspigargina de 100 nmol/L en las dos líneas celulares estudiadas (**Figura 4.50, A**). Sin embargo, el efecto de la taspigargina fue significativamente menor en las IR^{-/-} VSMCs (**Figura 4.50, B**), lo que podría deberse a la mayor expresión del IGF-IR observada en estas células en comparación con las IRLoxP^{+/+} VSMCs (**Figura 4.18**).

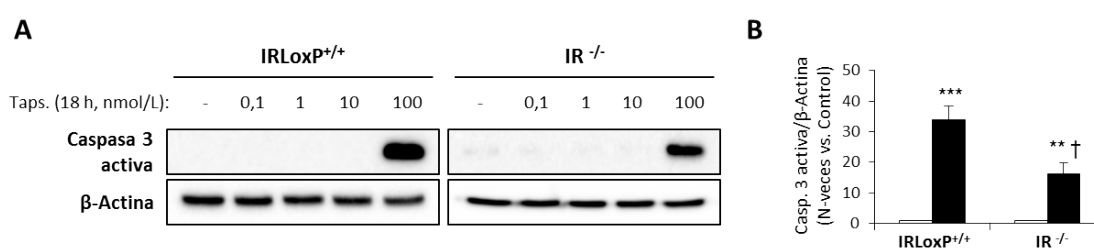


Figura 4.50 Efecto de la taspigargina en la apoptosis de las VSMCs. (A) Geles representativos de la expresión de la caspasa 3 activa analizada por *Western blot* en las IRLoxP^{+/+} e IR^{-/-} VSMCs tras el tratamiento con taspigargina a diferentes dosis durante 18 horas. (B) Cuantificación de la activación de la caspasa 3 inducida por la taspigargina (100 nmol/L) en las IRLoxP^{+/+} e IR^{-/-} VSMCs. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. **p<0,005, ***p<0,0005 vs. cada control; †p<0,05 vs. IRLoxP^{+/+} VSMCs.

Por último, comprobamos que el efecto de la taspigargina en las VSMCs se veía reducido por el pretratamiento de una hora con IGF-I, mientras que no lo hacía el pretratamiento con IGF-II, que incluso inducía mayores niveles de la caspasa 3 activa en las IR^{-/-} VSMCs (**Figura 4.51**). Estos resultados sugieren un papel antiapoptótico del IGF-I a través del IGF-IR, en las VSMCs, lo que contribuiría a la estabilidad de las placas ateroscleróticas al prevenir la pérdida de estas células.

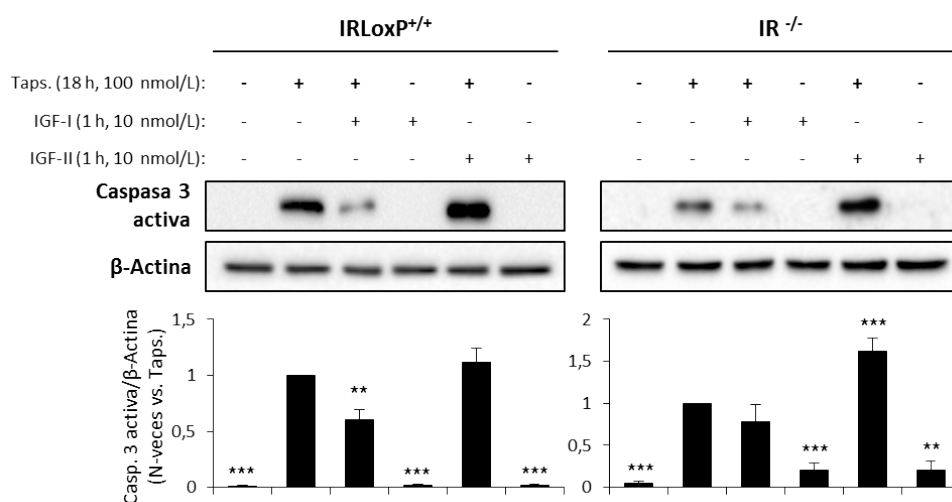


Figura 4.51 Efecto protector del IGF-I frente a la apoptosis inducida por taspigargina en las VSMCs. Geles representativos y cuantificación de la expresión de la caspasa 3 activa analizada por *Western blot* en las IRLoxP^{+/+} e IR^{-/-} VSMCs tras el pretratamiento de una hora con IGF-I (10 nmol/L) o IGF-II (10 nmol/L) seguido de taspigargina (100 nmol/L) durante 18 horas. Los experimentos fueron realizados al menos tres veces. **p<0,005, ***p<0,0005 vs. cada control.

5. Discusión

5.1 La lipoatrofia marrón severa agrava el proceso aterosclerótico experimental

El ratón BATIRKO y el doble *knock-out* BATIRKO; ApoE^{-/-} presentan una delección del receptor de insulina específica del tejido adiposo marrón que conduce a una lipoatrofia severa de dicho tejido, hecho que confiere por sí mismo susceptibilidad a la obesidad. En 1993, Lowell y colaboradores ya describieron que la ablación del BAT causaba el desarrollo de obesidad en ratones transgénicos (Lowell *et al.*, 1993). En este mismo sentido, un trabajo previo de nuestro grupo mostraba que la lipoatrofia marrón severa del ratón BATIRKO conducía a aumento de la adiposidad visceral (Gómez-Hernández *et al.*, 2012). En concordancia con ello, los resultados descritos en la primera parte de esta tesis ponen de manifiesto la presencia de una incrementada adiposidad visceral, principalmente debida al aumento del compartimento gonadal, en ambos grupos de ratones BATIRKO y BATIRKO; ApoE^{-/-}. Además, el volumen de grasa corporal total, estimado mediante imágenes de RMN, estaba aumentado en el ratón BATIRKO; ApoE^{-/-}.

En los últimos años, la cantidad de tejido adiposo marrón se ha relacionado inversamente con el índice de masa corporal (Cypess *et al.*, 2009) y, dada la sustancial contribución de la actividad del BAT a la prevención de la obesidad y sus complicaciones asociadas, nuevas estrategias terapéuticas están siendo desarrolladas, tanto en modelos experimentales como en humanos, con la finalidad de luchar contra la enfermedad (Poekes *et al.*, 2015). La regulación del BAT corre a cargo principalmente del sistema nervioso simpático, el cual puede ser activado por el ejercicio a través de la liberación de catecolaminas; sin embargo, evidencias recientes han dado a conocer un grupo de nuevos activadores del BAT que actúan de forma independiente a la estimulación simpática (Sánchez-Delgado *et al.*, 2015). Algunos de ellos son los péptidos natriuréticos cardíacos, la irisina, la IL-6, el ácido β -aminoisobutírico y el FGF21, que parecen ser sensibles al ejercicio y que pueden influir en el metabolismo del BAT. La exposición al frío o el trasplante de células madre de adipocitos marrones constituyen otras dos potenciales estrategias para inducir la activación y el crecimiento del BAT en el tratamiento de la obesidad humana (McMillan y White, 2015). Asimismo, se ha descrito que la marronización de células progenitoras o de adipocitos beige, presentes en el músculo esquelético o en el WAT, puede dar lugar a un fenotipo más similar al de los adipocitos marrones, con expresión de UCP-1, elevada densidad de mitocondrias y, en consecuencia, mayor capacidad termogénica (Schulz *et al.*, 2011; Sidossis *et al.*, 2015; Kim y Plutzky, 2016). Todos estos abordajes terapéuticos van encaminados a lograr una mayor activación del BAT que, además, puede tener acciones beneficiosas sobre el metabolismo de las lipoproteínas al promover la captación de triglicéridos por el BAT y el consiguiente aclaramiento hepático de partículas remanentes, reduciendo la hipercolesterolemia y protegiendo frente al desarrollo de aterosclerosis (Bartelt *et al.*, 2011; Berbée *et al.*, 2015). En relación a esto, en nuestro modelo BATIRKO; ApoE^{-/-} la lipoatrofia marrón severa incrementa la hipertrigliceridemia observada en el ratón ApoE^{-/-}.

Además de alteraciones en el perfil lipídico, hemos puesto de manifiesto que el ratón BATIRKO; ApoE^{-/-} también desarrolla alteraciones en el metabolismo de la glucosa, que no están presentes en el ratón ApoE^{-/-}. Una de las funciones que han sido atribuidas al BAT en los últimos años es la regulación de la homeostasis glucídica (Jacene *et al.*, 2011; Peirce y Vidal-Puig, 2013; Stanford *et al.*, 2013). En este contexto, se ha propuesto que la activación del BAT en los humanos también puede tener efectos metabólicos beneficiosos que podrían ser dirigidos contra las complicaciones de la obesidad, como la diabetes tipo 2, al mejorar los cambios glucolipotóxicos subyacentes al desarrollo de resistencia a la insulina y a la deficiencia en la secreción de esta hormona por fallo de la célula β pancreática (Peirce y Vidal-Puig, 2013). De forma esperable dada la ausencia del receptor de insulina en el BAT, el modelo BATIRKO; ApoE^{-/-} presentaba una resistencia primaria a la insulina en este tejido y, además, encontramos una resistencia secundaria en otros tejidos. Así, la señalización de insulina estaba disminuida en el hígado, lo que puede deberse a la presencia de hígado graso y a los elevados niveles de la citoquina proinflamatoria TNF- α observados en este tejido, así como en el corazón, la arteria aorta, WAT gonadal y el PVAT torácico del ratón BATIRKO; ApoE^{-/-}.

En relación al daño vascular, los resultados mostrados en esta tesis sugieren que la lipoatrofia marrón agrava el proceso aterosclerótico, como demuestra el incremento estadísticamente significativo de la acumulación lipídica, la carga aterosclerótica, el tamaño y complejidad de la lesión, el infiltrado de macrófagos y la expresión de marcadores de daño vascular e inflamación. En este sentido, se ha sugerido que la disfunción mitocondrial en el tejido adiposo provoca un síndrome lipodistrófico caracterizado por resistencia a la insulina, esteatosis hepática, hipertensión y disfunción cardíaca (Vernochet *et al.*, 2014). Por el contrario, la activación del BAT protege del desarrollo de aterosclerosis (Berbée *et al.*, 2015), como se ha discutido anteriormente.

Previamente nuestro grupo demostró que la lipoatrofia marrón severa y el incremento de la adiposidad visceral inducen resistencia vascular a la insulina y disfunción vascular a través de la sobreexpresión de un conjunto adipoquinas (Gómez-Hernández *et al.*, 2012). Por esta razón, quisimos estudiar en el nuevo modelo BATIRKO; ApoE^{-/-} la expresión de adipoquinas proinflamatorias en distintos compartimentos del órgano adiposo, incluido el PVAT torácico, que pueden ser responsables de un efecto inflamatorio local que explicaría la resistencia vascular a la insulina presente en este modelo. Observamos un incremento significativo de los niveles de TNF- α en el BAT y en el tPVAT, así como de la secreción de leptina por el gWAT y el tPVAT, mientras que la expresión de adiponectina estaba disminuida en el WAT visceral del ratón BATIRKO; ApoE^{-/-} en comparación con el ApoE^{-/-}. En la misma línea, un estudio llevado a cabo en pacientes obesos mostraba que cambios proinflamatorios en el tejido adiposo se asociaban con disfunción arterial sistémica y resistencia a la insulina, lo que sugiere una relación directa entre la inflamación del tejido adiposo y el daño vascular que conduce a un mayor riesgo cardiovascular en los individuos obesos (Apovian *et al.*, 2008).

Con el análisis de la expresión de adipoquinas proinflamatorias en los distintos compartimentos adiposos perseguíamos investigar la existencia de una contribución diferencial de la grasa visceral (gWAT y rpWAT) y subcutánea (iWAT) a la resistencia a la insulina y al daño vascular observados en el ratón BATIRKO; ApoE^{-/-}. De esta forma, el perfil

inflamatorio en el gWAT resultó ser mayor que en el iWAT. En este sentido, es conocido que el tejido adiposo visceral presenta distintas propiedades funcionales en comparación con el subcutáneo, como la producción alterada de adipoquinas que tiene lugar en la obesidad (Item y Konrad, 2012). Recientemente, en pacientes sometidos a una cirugía aórtica abdominal, se han visto diferencias en el perfil inflamatorio de los distintos depósitos de grasa abdominal, presentando el compartimento visceral y, especialmente, el mesentérico, una mayor asociación con la disfunción metabólica sistémica que precede a la diabetes tipo 2 y a la enfermedad vascular (Kranendonk *et al.*, 2015). En cuanto al tejido adiposo perivascular, nos centramos en el estudio del PVAT torácico, que posee un fenotipo más semejante al del BAT que el PVAT abdominal (Padilla *et al.*, 2013; Gil-Ortega *et al.*, 2015), así como en su contribución al proceso aterosclerótico. El tPVAT del grupo BATIRKO; ApoE^{-/-} presentaba un perfil más inflamatorio que el del grupo ApoE^{-/-}, con elevados niveles de TNF- α y leptina y una expresión disminuida de adiponectina. Así, la leptina secretada por el PVAT puede actuar de forma paracrina promoviendo la proliferación de las VSMCs (Miao y Li, 2012) o la disfunción endotelial (Payne *et al.*, 2014), y el TNF- α contribuiría, de igual manera, a la resistencia a la insulina observada en la arteria aorta.

En resumen, la lipoatrofia marrón severa conduce a un aumento de la adiposidad visceral, intolerancia a la glucosa e hipoinsulinemia, y favorece un perfil lipídico proaterogénico con hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Además, la secreción de adipoquinas proinflamatorias por el tejido adiposo, incluido el tPVAT, contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina a nivel vascular. Todas estas alteraciones metabólicas y vasculares observadas en el ratón BATIRKO; ApoE^{-/-} agravan el proceso aterosclerótico que tienen lugar en el modelo ApoE^{-/-} de aterosclerosis experimental (**Figura 5.1**).

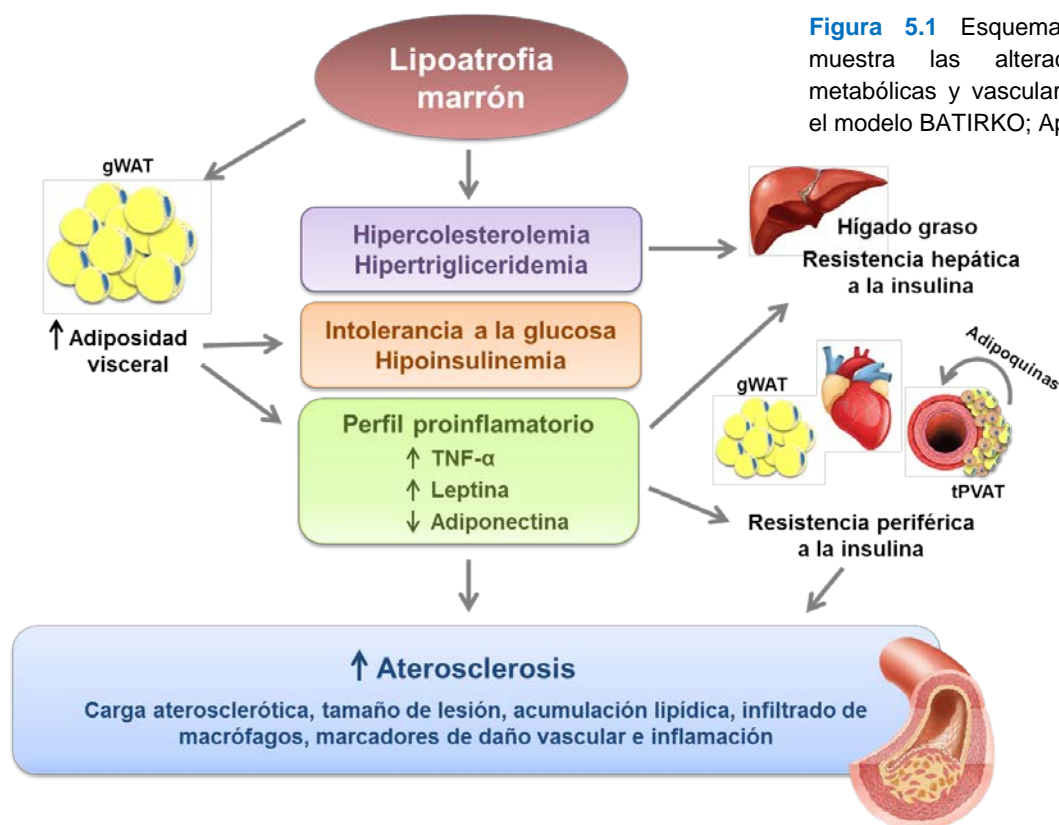


Figura 5.1 Esquema que muestra las alteraciones metabólicas y vasculares en el modelo BATIRKO; ApoE^{-/-}.

5.2 El papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos en las fases iniciales del proceso aterosclerótico

En las etapas iniciales del proceso aterosclerótico, como resultado de la lesión vascular, se producen cambios en el entorno de las células de músculo liso vascular, entre los que se incluyen el aumento de la disponibilidad de factores de crecimiento y alteraciones celulares, que conducen a una proliferación y migración de las VSMCs anormalmente elevadas y, en consecuencia, a la formación de una placa aterosclerótica organizada (Johnson, 2014). Por esta razón, un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes a estos procesos es de crucial importancia para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que ayuden a frenar la progresión de la aterosclerosis y la aparición de sus consecuencias clínicas.

En esta parte de la tesis hemos abordado el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la migración de las VSMCs y, concretamente, la contribución de las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos IR/IGF-IR a este proceso. Para ello, utilizamos cuatro líneas de VSMCs de aorta de ratón: IRLoxP^{+/+} VSMCs (con IR), IR^{-/-} VSMCs (sin IR), IRA VSMCs (expresan exclusivamente la isoforma IRA) e IRB VSMCs (solo expresan la isoforma IRB). Estudiamos, en primer lugar, la activación de las rutas PI3K/Akt y MAPK, las dos principales vías de señalización a través de las cuales la insulina y los IGFs ejercen sus efectos sobre el metabolismo celular, crecimiento y supervivencia (Siddle, 2011).

En trabajos previos de nuestro grupo se había descrito que la insulina inducía una señalización más duradera en células β que solo expresan la isoforma IRA (Bartolomé *et al.*, 2010) y una mayor estimulación de las vías PI3K/Akt o MAPK en las IRA VSMCs (Gómez-Hernández *et al.*, 2013), en comparación con aquellas células que expresan exclusivamente la isoforma IRB. En esta tesis, hemos demostrado que la isoforma IRA en las VSMCs media una mayor activación de Akt, p70 S6K y p44/42 MAPK que la IRB en respuesta, no solo a la insulina, sino también a los IGFs. Asimismo, la fosforilación de estas quinasas era más pronunciada cuando las IRA VSMCs se estimulaban con los IGFs, especialmente con IGF-II. En este sentido, se ha descrito que la isoforma IRA presenta elevada afinidad por la insulina, intermedia por el IGF-II y baja afinidad por el IGF-I, mientras que IRB es un receptor altamente específico para la insulina (Frasca *et al.*, 1999). Además, en fibroblastos de ratón que solo expresan la isoforma IRA y que carecen del IGF-IR, el IGF-II, a pesar de producir una menor autofosforilación de IRA, inducía un mayor ratio de activación p70 S6K/Akt en comparación con la insulina. El IGF-I conducía a un patrón de señalización similar al del IGF-II, aunque su unión a IRA tenía lugar con mucha menor afinidad que la del IGF-II (Sacco *et al.*, 2009).

La diabetes tipo 2 y el síndrome metabólico son factores de riesgo bien conocidos para la aterosclerosis, en parte debido a la resistencia a la insulina y/o la hiperinsulinemia que, frecuentemente, están presentes en estas patologías (Stout, 1991; Nigro *et al.*, 2006). Por otra parte, la aterosclerosis acelerada en pacientes diabéticos se ha asociado con el hecho de que

VSMCs procedentes de estos pacientes presentan una velocidad de proliferación, adhesión y migración significativamente elevada (Faries *et al.*, 2001). En este contexto, distintos autores han examinado el efecto de la insulina en la migración de las VSMCs, aunque con resultados controvertidos. Yang y Kahn describían que concentraciones fisiológicas de insulina no causaban ningún efecto en la migración de VSMCs de rata, pero que la incrementaban cuando las células se estimulaban conjuntamente con Ang II o la inhibían en presencia de NO (Yang y Kahn, 2008). En VSMCs de aorta bovina, una concentración de 10 nmol/L de insulina estimulaba de forma moderada la migración estas células, principalmente a través de la activación de la ruta de las MAPKs, mientras que favorecía la quiescencia y diferenciación de las VSMCs a través de la señalización dependiente de la PI3K (Wang *et al.*, 2003). Otros estudios encontraron que una dosis mayor de insulina (100 nmol/L) inducía tanto la migración como la proliferación de VSMCs humanas y de rata (Abhijit *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2014). Sin embargo, a una concentración suprafisiológica, la insulina puede estimular la migración de las VSMCs mediante la activación del IGF-IR (Bornfeldt *et al.*, 1994). En relación a esto, observamos que la insulina a una dosis de 100 nmol/L era capaz de inducir la fosforilación en tirosina del IGF-IR en las IRLoxP^{+/+} VSMCs. En los estudios de migración celular encontramos que una concentración de insulina de 10 nmol/L, que no activaba el IGF-IR, conducía a un mayor incremento de la migración de las IRA VSMCs en comparación con las IRB VSMCs, mientras que no tenía efecto en las IR^{-/-} VSMCs, indicando que la insulina ejerce su efecto sobre la migración de las VSMCs a través del IR y, principalmente de la isoforma IRA (**Figura 5.2**).

A diferencia de la insulina, el IGF-I promovía fuertemente la migración de las VSMCs y este efecto parecía estar mediado principalmente por el IGF-IR (**Figura 5.2**), como sugiere el incremento significativo observado en la migración de las células que carecen del IR. De forma coherente, está bien establecido que el IGF-I es un potente inductor de la migración y proliferación de las VSMCs como resultado de la unión a su propio receptor (Bornfeldt *et al.*, 1994; Gockerman *et al.*, 1995; Duan *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2004). También se ha descrito que el IGF-II estimula la migración de las VSMCs a través del IGF-IR, aunque de forma menos potente que el IGF-I (Bornfeldt *et al.*, 1994; Gockerman *et al.*, 1995). Puesto que el IGF-II solamente indujo la migración de las IRA VSMCs, nuestros hallazgos sugieren que el IGF-II requiere la presencia de la isoforma IRA, ya sea como homodímero o formando parte de los receptores híbridos IRA/IGF-IR, para inducir la migración de las VSMCs (**Figura 5.2**).

Mediante los estudios de migración en presencia de picropodofilina (PPP), un inhibidor altamente específico para el IGF-IR, hemos demostrado la implicación de este receptor en la migración de las VSMCs. PPP bloquea específicamente la fosforilación de la tirosina 1136 del IGF-IR, localizada en el *loop* de activación del dominio tirosina quinasa, que estabiliza la conformación con óptima actividad catalítica y permite la autofosforilación de otros residuos de tirosina de la subunidad β (Vasilcanu *et al.*, 2004). Sin embargo, este inhibidor no interfiere en la actividad del IR u otros receptores tirosina quinasa (Girnita *et al.*, 2004). La inhibición del IGF-IR por PPP suprimía por completo la migración inducida por la insulina y por el IGF-II en las IRB VSMCs, mientras que la migración de las IRA VSMCs solo se inhibía parcialmente. Por el contrario, la migración estimulada por el IGF-I era inhibida por PPP a un nivel similar en ambas líneas celulares. Teniendo en cuenta que la autofosforilación de los receptores

híbridos IR/IGF-IR tiene lugar mediante una reacción intramolecular en la que cada subunidad β transfiere grupos fosfato a la otra (Frattali y Pessin, 1993), podemos considerar que la transducción de la señal a través de los receptores híbridos, al igual que ocurre en los homodímeros del IGF-IR, se ve impedida por el tratamiento con PPP. En base a esto, la migración remanente al inhibir el IGF-IR estaría mediada por la isoforma IRA en forma de homodímero, y no por la IRB, tras la estimulación con insulina o IGF-II. Asimismo, el efecto del IGF-I en la migración de las VSMCs, no bloqueado por completo con la presencia de PPP, podría explicarse por la activación del IR, además del IGF-IR, inducida por el IGF-I en las IRLoxP^{+/+} VSMCs.

La presencia de receptores híbridos IR/IGF-IR en VSMCs humanas o de rata ha sido descrita por otros autores (Chisalita y Arnqvist, 2005; Johansson y Arnqvist, 2006), y nosotros previamente habíamos demostrado que las dos posibles formas de receptores híbridos (IRA/IGF-IR e IRB/IGF-IR) se expresan en nuestras líneas de VSMCs (Gómez-Hernández *et al.*, 2013). Tanto la insulina como los IGFs son capaces de estimular los receptores híbridos IRA/IGF-IR, siendo la insulina menos eficaz; en cuanto a la activación de los receptores híbridos IRB/IGF-IR, la insulina y el IGF-II son mucho menos eficaces que el IGF-I (Pandini *et al.*, 2002; Vigneri *et al.*, 2016). La proporción de receptores híbridos en la membrana celular depende de la abundancia relativa de los receptores individuales IR e IGF-IR, pues se piensa que la heterodimerización de los dos receptores ocurre con una eficiencia similar a la homodimerización (Baillyes *et al.*, 1997). En este sentido, Pandini y colaboradores concluyeron que la expresión de los receptores híbridos estaba directamente relacionada con la sobreexpresión del IR en cáncer de mama (Pandini *et al.*, 1999). Estos hechos son consistentes con los resultados obtenidos que sugieren que la expresión la isoforma IRA y, por tanto, la formación de receptores híbridos IRA/IGF-IR, se ve incrementada por la insulina y por el IGF-II, y esto puede favorecer la migración de las VSMCs.

La enfermedad aterosclerótica humana ha sido clasificada por la Asociación Americana del Corazón (AHA, del inglés *American Heart Association*) en ocho tipos de lesión, desde lesiones tempranas, entre las que se incluyen las lesiones iniciales y las de tipo estría grasa, hasta las lesiones ateroscleróticas avanzadas (Stary *et al.*, 1995). En la aterosclerosis temprana, el IGF-IR puede contribuir a la progresión aterosclerótica al mediar las acciones proaterogénicas de los IGFs. Así, la expresión del IGF-IR a nivel de su mRNA se ha visto incrementada en VSMCs de placas ateroscleróticas de pacientes asintomáticos en comparación con aquellas procedentes de pacientes sintomáticos (Jia *et al.*, 2007). También se ha descrito una expresión aumentada del IGF-IR en células espumosas derivadas de VSMCs presentes en lesiones ateroscleróticas de conejo (Polanco *et al.*, 1995), en consonancia con el incremento de dicho receptor, tanto en sus niveles proteicos como de mRNA, que encontramos en la aorta de los ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas de edad. En la misma línea, un estudio reciente mostraba que la deficiencia del IGF-IR específica de monocitos/macrófagos en ratones ApoE^{-/-} incrementaba significativamente la formación de la lesión aterosclerótica y modificaba la composición de la misma hacia un fenotipo menos estable (Higashi *et al.*, 2016). Puesto que el IGF-I es un potente mitógeno para las VSMCs, numerosos estudios llevados a cabo en modelos de aterosclerosis experimental sugieren que el IGF-I promueve la hiperplasia vascular

favoreciendo el crecimiento de la neointima (Higashi *et al.*, 2014). En particular, la sobreexpresión del IGF-I en las VSMCs de ratones ApoE^{-/-} incrementaba el número de VSMCs en las placas ateroscleróticas, el contenido en colágeno y el área de la cápsula fibrosa, favoreciendo la estabilidad de la placa (Shai *et al.*, 2010). En lo que respecta al IGF-II, se ha propuesto como un promotor esencial del crecimiento de las lesiones ateroscleróticas en el modelo ApoE^{-/-} y la sobreexpresión local del mismo capaz inducir por sí misma la aparición de engrosamientos focales de la íntima (Zaina *et al.*, 2002). En este sentido, la expresión de la isoforma IRA estaba significativamente aumentada en la aorta de los ratones ApoE^{-/-} de 24 semanas de edad, lo que puede favorecer las acciones proaterogénicas del IGF-II.

En esta tesis mostramos, por primera vez, que la expresión génica de la isoforma IRA, del IGF-IR y de los IGFs está notablemente incrementada en la capa media, principalmente compuesta por VSMCs, de aortas humanas con lesiones ateroscleróticas tempranas. Además, en el modelo ApoE^{-/-} observamos que las VSMCs presentes en la íntima de las placas fibrosas expresaban el IR y el IGF-IR. Por todo ello, una expresión incrementada de la isoforma IRA y del IGF-IR podría ser necesaria para la migración de las VSMCs de la capa media a la íntima en las etapas iniciales del proceso aterosclerótico (**Figura 5.2**).

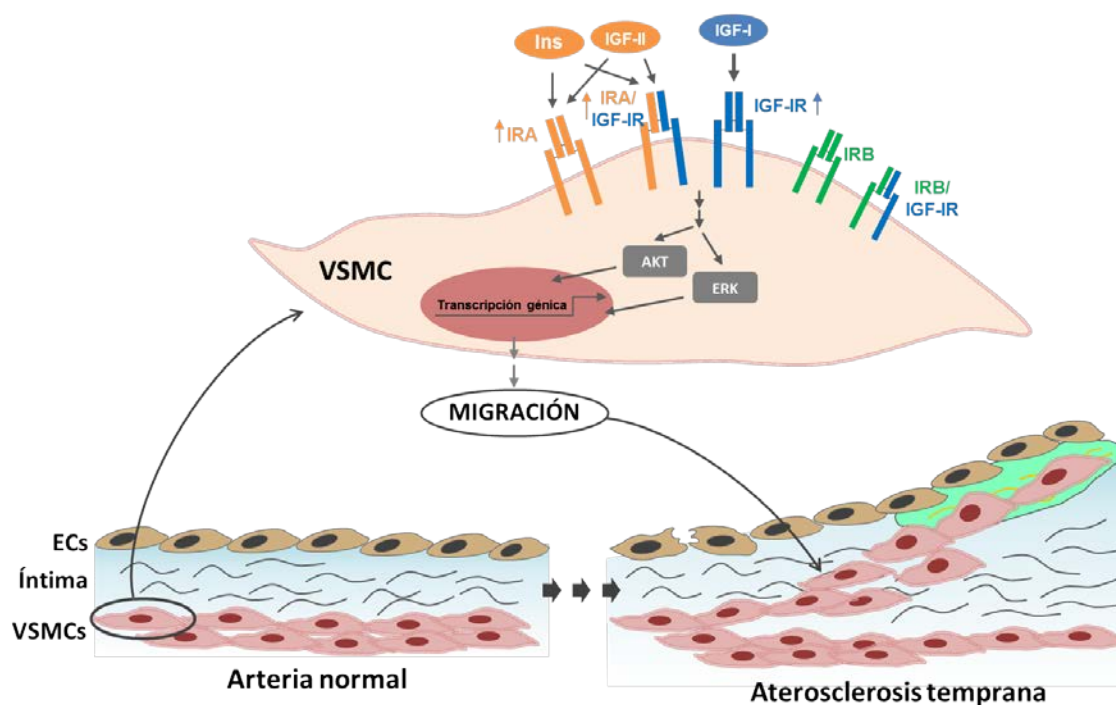


Figura 5.2 Representación esquemática del papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y los receptores híbridos en la migración de las VSMCs. En el modelo propuesto, el IGF-I principalmente a través del IGF-IR y la insulina y el IGF-II mediante su unión la isoforma IRA, como homodímero o formando parte de los receptores híbridos IRA/IGF-IR, pueden favorecer la migración de las VSMCs contribuyendo al crecimiento de la placa en las etapas tempranas de la aterosclerosis. ECs: células endoteliales; VSMCs: células de músculo liso vascular.

5.3 El papel de las isoformas del IR, el IGF-IR y el IGF-IIR en las fases avanzadas del proceso aterosclerótico

A diferencia de lo que ocurre en las etapas iniciales, en las que el aumento de la proliferación y migración de las células de músculo liso vascular favorece la progresión del proceso aterosclerótico, en las lesiones avanzadas la presencia de VSMCs resulta, generalmente, beneficiosa al contribuir a la estabilidad de las mismas (Bennett *et al.*, 2016). De hecho, estudios clínicos indican que las placas ateroscleróticas con una relativa disminución de las VSMCs y cápsulas fibrosas más débiles, así como un incremento de células inflamatorias, son más propensas a la rotura (Fayad y Fuster, 2001; Hamdan *et al.*, 2007). En este sentido, se ha descrito que las VSMCs presentes en las lesiones ateroscleróticas avanzadas muestran una mayor apoptosis que aquellas de arterias normales (Bennett *et al.*, 1995).

Por otro lado, los resultados discutidos en el apartado anterior demuestran que la isoforma IRA y el IGF-IR tienen un papel relevante en la migración de las VSMCs durante la aterosclerosis temprana. Así pues, nos planteamos como último objetivo de la tesis si estos receptores podrían ser importantes, además de en las fases iniciales, en los estadios más avanzados del proceso aterosclerótico y, concretamente, en la apoptosis de las VSMCs. Para ello, hemos empleado placas de pacientes con aterosclerosis carotídea, distintos modelos experimentales y dos líneas de VSMCs de aorta de ratón: IRLoxP^{+/+} VSMCs (con IR) e IR^{-/-} VSMCs (sin IR).

En primer lugar, se analizó la expresión del IR, el IGF-IR, el IGF-IIR y los IGFs en placas ateroscleróticas humanas complicadas (inestables) y no complicadas (estables). Los estudios disponibles en la literatura apuntan a una reducida expresión de los IGFs y el IGF-IR en placas avanzadas de aterosclerosis humana. Wang y colaboradores describían que la expresión génica del IGF-I, del IGF-II y de ciertas IGFBPs estaba disminuida en placas de aterosclerosis carotídea en comparación con arterias normales (Wang *et al.*, 2012). Además, en placas ateroscleróticas humanas se ha observado una menor expresión del IGF-I y del IGF-IR en las VSMCs de la íntima, especialmente en la región de los hombros con infiltración de macrófagos (Okura *et al.*, 2001). Otro trabajo describía también una marcada reducción del IGF-IR en las VSMCs de la íntima, en particular en la cápsula fibrosa y en los hombros, de lesiones ateroscleróticas humanas, localizando en macrófagos la expresión del receptor observada en estas regiones (Patel *et al.*, 2001). En relación a esto, nosotros hemos encontrado menores niveles proteicos del IR, el IGF-IR, el IGF-IIR y los IGFs en la capa media y en la íntima fibrosa respecto a la región de los hombros de placas complicadas de aterosclerosis carotídea. La región de los hombros, en contraposición a la cápsula fibrosa en la que predominan las VSMCs, se caracteriza por un mayor porcentaje de células inflamatorias (macrófagos y linfocitos T) (Martín-Ventura *et al.*, 2004), que podrían ser responsables del aumento de los receptores y los IGFs observado en estas zonas de la placa. Sin embargo, aunque no se planteó como objetivo de esta tesis, serían necesarios estudios de colocalización

para concluir que las diferencias en la expresión de los IGFs y sus receptores encontradas entre las distintas regiones de las placas son debidas a la presencia de distintos tipos celulares en las mismas.

Las isoformas del IR presentan diferentes características funcionales. Mientras que la isoforma IRB está preferentemente asociada a señales metabólicas y de diferenciación, una expresión predominante de la isoforma IRA se relaciona con una disminución de la señalización metabólica de la insulina y un incremento de la señalización de los IGFs, favoreciendo el crecimiento, proliferación y supervivencia celular (Belfiore *et al.*, 2009). No se conocen datos previos acerca del perfil de expresión de las isoformas del IR en los diferentes estadios del proceso aterosclerótico. En esta tesis hemos demostrado que, si bien las lesiones iniciales presentan un importante aumento de la isoforma IRA, su expresión se ve reducida en placas complicadas de pacientes con aterosclerosis carotídea; y que, además, esta disminución de la isoforma IRA va acompañada de un incremento de la IRB. Como se ha discutido en el apartado 5.2, el aumento de la expresión de la isoforma IRA puede favorecer las acciones proaterogénicas del IGF-II durante las etapas iniciales de la aterosclerosis. Por el contrario, en fases más avanzadas, en las que la acción local del IGF-II previene el debilitamiento de la placa al promover la proliferación de las VSMCs en la íntima (Zaina *et al.*, 2002), una disminución del ratio IRA/IRB favorecería la inestabilidad de las lesiones ateroscleróticas.

Aunque no se observaron cambios en la asociación del IRS-1 con las isoformas del IR, su fosforilación en residuos de serina estaba incrementada en placas ateroscleróticas humanas complicadas. La fosforilación de estos residuos se ha asociado con estados de resistencia a la insulina inducidos por citoquinas como el TNF- α , pues inhibe la fosforilación en tirosina del IRS-1 dando lugar a una deficiente señalización de insulina (Aguirre *et al.*, 2000). Existen amplias evidencias clínicas de que la resistencia a la insulina aumenta el riesgo de aterosclerosis, incluso en ausencia de hiper glucemia. Los síndromes de resistencia a la insulina pueden promover tanto la aterogénesis como la progresión de las lesiones avanzadas, y los mecanismos responsables implican, además de factores sistémicos como la dislipemia, la hipertensión o los estados proinflamatorios, una alterada señalización de insulina a nivel local en las células que participan en la aterosclerosis, incluyendo las células endoteliales, las VSMCs y los macrófagos (Bornfeldt y Tabas, 2011). En este sentido, placas ateroscleróticas de pacientes diabéticos presentan una mayor área del núcleo necrótico, mayor infiltración de células inflamatorias y una incrementada apoptosis de las VSMCs y los macrófagos (Burke *et al.*, 2004).

Además de la disminución de la isoforma IRA, encontramos una reducida expresión del IGF-IR en placas carotídeas complicadas comparativamente con placas no complicadas. El IGF-I a través del IGF-IR previene la apoptosis, promueve la formación de matriz extracelular y estimula la proliferación y migración de las VSMCs. Se ha descrito asimismo que es menos potente induciendo la supervivencia de las VSMCs procedentes de muestras de endarterectomía carotídea de pacientes sintomáticos que de aquellas de sujetos asintomáticos (Jia *et al.*, 2006). En este contexto, la disminución del IGF-IR y del IGF-I en placas ateroscleróticas avanzadas se ha asociado a una mayor apoptosis de las VSMCs, contribuyendo al debilitamiento y rotura de la placa (Okura *et al.*, 2001; von der Thüsen *et al.*, 2011). Por el

contrario, el IGF-IIR estaba aumentado en lesiones complicadas de aterosclerosis carotídea. Existen evidencias de que el IGF-IIR, además de mediar la internalización y degradación lisosomal del IGF-II (Ghosh *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2009), puede dirigir una señalización intracelular que intervine en la regulación del comportamiento celular (Okamoto y Nishimoto, 1991; McKinnon *et al.*, 2001; Hawkes *et al.*, 2006; Harris y Westwood, 2012). La deficiencia del IGF-IIR en ratones transgénicos causa hiperplasia ventricular cardíaca caracterizada por un incremento de la proliferación de los cardiomiocitos fetales (Lau *et al.*, 1994). Por otra parte, la ligadura de la aorta abdominal en ratas induce la expresión del IGF-IIR y la apoptosis de los cardiomiocitos en el corazón (Lee *et al.*, 2006). Lee y colaboradores proponían un papel clave del IGF-II y del IGF-IIR en la apoptosis de los cardiomioblastos inducida por Ang II al incrementar la expresión del IGF-IIR. Otros trabajos posteriores apoyan la idea de que el IGF-II, actuando a través del IGF-IIR, puede promover la muerte de los miocitos cardíacos (Chu *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2015). Según estos datos, el incremento de la expresión del IGF-IIR en lesiones ateroscleróticas complicadas podría contribuir a su inestabilidad mediante dos posibles mecanismos: reduciendo la biodisponibilidad del IGF-II y, por tanto, sus efectos sobre la supervivencia celular, o bien promoviendo la apoptosis de las células presentes en la placa.

Las placas ateroscleróticas inestables, propensas a la rotura, están típicamente asociadas a la presencia de una elevada cantidad de células inflamatorias y un extenso núcleo necrótico recubierto por una cápsula fibrosa delgada, esta última caracterizada por la disminución del número de VSMCs y del contenido de matriz extracelular (Silvestre-Roig *et al.*, 2014). Nosotros hemos encontrado que placas complicadas de pacientes con aterosclerosis carotídea tienen un menor contenido de VSMCs que aquellas placas estables. La presencia de apoptosis en las lesiones ateroscleróticas humanas ha sido confirmada por distintos autores (Bennett *et al.*, 1995; Geng y Libby, 1995; Han *et al.*, 1995; Björkerud y Björkerud, 1996; Martín-Ventura *et al.*, 2004) y se considera el mecanismo principalmente responsable de la pérdida de VSMCs. Así, en placas inestables obtenidas por aterectomía coronaria se ha observado, en comparación con lesiones estables, una mayor cantidad de VSMCs apoptóticas y un descenso en el número total de células (Bauriedel *et al.*, 1999).

Con el objetivo de comprobar si los hallazgos derivados del estudio de placas ateroscleróticas humanas podían ser reproducidos en modelos experimentales de aterosclerosis, empleamos tres grupos de ratones (Control, ApoE^{-/-} y BATIRKO; ApoE^{-/-}) y dos diseños experimentales diferentes. En el primero de ellos, los animales fueron alimentados con una dieta rica en grasa a fin de acelerar el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas hasta su sacrificio a las 24 semanas de edad. En el segundo, los animales, alimentados con una dieta normal, se mantuvieron hasta la edad de 15 meses. Sin embargo, la principal limitación de esta aproximación es que los ratones hiperlipidémicos modificados genéticamente, como el modelo ApoE^{-/-}, aunque muestran algunas de las características de las lesiones avanzadas humanas, rara vez desarrollan rotura de placa o trombosis, dos de las complicaciones más frecuentes de la aterosclerosis humana (Schwartz *et al.*, 2007). A pesar de que no existían cambios en los niveles proteicos del IR total entre los distintos grupos de animales, el perfil de expresión génica de las isoformas del IR en la aorta de los grupos ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas resultó ser claramente diferente. Mientras que en el primero la isoforma IRA estaba

incrementada, en el segundo encontramos una disminución de esta isoforma junto con un aumento de la isoforma IRB. Estas diferencias muy probablemente se deban al agravamiento de las lesiones ateroscleróticas que presenta el modelo BATIRKO; ApoE^{-/-} respecto al ApoE^{-/-}, y son coherentes con los resultados obtenidos en placas ateroscleróticas humanas. No ocurre lo mismo en el caso del IGF-IR que estaba aumentado en los grupos ApoE^{-/-} WD y BATIRKO; ApoE^{-/-} WD de 24 semanas, así como en los ratones BATIRKO; ApoE^{-/-} de 15 meses de edad, en contraposición a la reducida expresión observada en lesiones complicadas de aterosclerosis humana.

Una pérdida importante de VSMCs, de forma similar a las placas humanas complicadas, tiene lugar en las lesiones del ratón BATIRKO; ApoE^{-/-}, tanto en el modelo de 24 semanas alimentado con dieta tipo *Western* como en el de 15 meses con dieta estándar. Esta disminución de las VSMCs se correlaciona, además, con un marcado aumento del número de células apoptóticas, lo que sugiere un papel destacado de la apoptosis de las VSMCs en las lesiones avanzadas de la aterosclerosis experimental. En la misma línea, mediante la generación de ratones transgénicos con inducción selectiva de apoptosis en las VSMCs y genotipo ApoE^{-/-}, Clarke y colaboradores concluían que la apoptosis de las VSMCs es suficiente por sí misma para inducir características de placas ateroscleróticas vulnerables, tales como una cápsula fibrosa marcadamente más delgada, la pérdida de colágeno y matriz extracelular, la acumulación de detritos celulares y una intensa inflamación en la íntima (Clarke *et al.*, 2006). Además, una apoptosis crónica de las VSMCs acelera tanto la aterogénesis como la progresión de las lesiones ya establecidas y promueve la calcificación de las mismas (Clarke *et al.*, 2008).

Los resultados *in vitro* demuestran que la inhibición del IGF-IR induce la apoptosis de las VSMCs. Asimismo, una mayor expresión del IGF-IR en las IR^{-/-} VSMCs, probablemente debida a un mecanismo compensatorio por la ausencia del IR en estas células, reduce la apoptosis estimulada por la tapsigargina. Por último, el IGF-I, y no el IGF-II, ejerce un efecto protector frente a la apoptosis inducida por la tapsigargina en las VSMCs. De forma coherente con estos hallazgos, se ha descrito que VSMCs procedentes de placas ateroscleróticas humanas muestran una sensibilidad intrínseca a la apoptosis causada, al menos en parte, por una reducida expresión del IGF-IR y una deficiente señalización de supervivencia en respuesta al IGF-I (Patel *et al.*, 2001). La presencia de LDL oxidadas en las lesiones ateroscleróticas se ha propuesto como un mecanismo inductor de apoptosis en las VSMCs, efecto que era suprimido por la sobreexpresión del IGF-IR mediante el uso de adenovirus en VSMCs humanas (Li *et al.*, 2003). Así, las LDL oxidadas reducen los niveles del IGF-IR e inducen la apoptosis de las VSMCs a través de un mecanismo que implica la producción de especies reactivas de oxígeno (Higashi *et al.*, 2005).

En resumen, los resultados obtenidos en placas ateroscleróticas humanas complicadas, con una disminución del ratio IRA/IRB y del IGF-IR y un aumento del IGF-IIR, muestran un escenario que podría contribuir a la apoptosis y consecuente pérdida de VSMCs, favoreciendo la inestabilidad de la placa e incrementando el riesgo de rotura y sus consecuencias clínicas (**Figura 5.3**). Algunos de estos eventos, aunque no todos, ocurren también en modelos experimentales con lesiones avanzadas, como son el descenso de la isoforma IRA en favor de la IRB, la disminución del número de VSMCs y el incremento de la apoptosis. Además, los

resultados *in vitro* indican un importante papel antiapoptótico del IGF-IR en las VSMCs, que podría prevenir la inestabilidad de las lesiones ateroscleróticas.

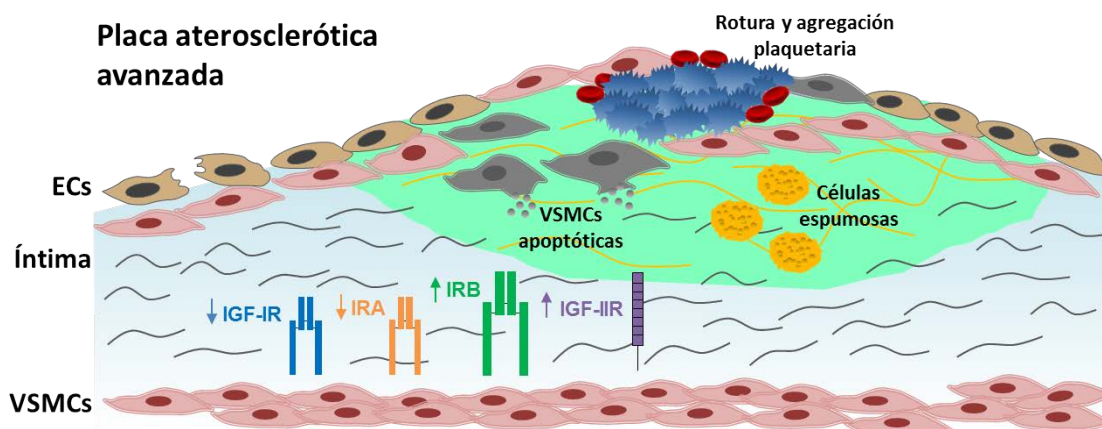


Figura 5.3 Representación esquemática de una placa aterosclerótica avanzada. Se muestra el perfil de expresión de las isoformas del IR, el IGF-IR y el IGF-IIR observado en placas ateroscleróticas humanas complicadas, que podría contribuir a la apoptosis y pérdida de VSMCs favoreciendo la inestabilidad de la placa e incrementando el riesgo de rotura. ECs: células endoteliales; VSMCs: células de músculo liso vascular.

6. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en la presente tesis, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

1. La lipoatrofia marrón severa confiere susceptibilidad a la obesidad y conduce a alteraciones metabólicas y vasculares que agravan el proceso aterosclerótico. Así, la activación del tejido adiposo marrón podría proteger frente a la obesidad y sus complicaciones metabólicas y vasculares asociadas.
2. El IGF-I es un importante inductor de la migración de las células de músculo liso vascular principalmente a través de su receptor, el IGF-IR, y en menor medida a través del receptor de insulina. La insulina y el IGF-II, sin embargo, son menos potentes y requieren la presencia de la isoforma IRA, en forma de homodímeros o formando parte de los receptores híbridos IRA/IGF-IR, para inducir la migración de estas células.
3. Durante las etapas tempranas del proceso aterosclerótico, la sobreexpresión del IGF-IR o de la isoforma IRA puede favorecer la migración y proliferación de las células de músculo liso vascular contribuyendo a la progresión de la aterosclerosis experimental y humana.
4. El IGF-I a través del IGF-IR ejerce un efecto antiapoptótico en las células de músculo liso vascular, que podría prevenir la pérdida de estas células y, con ello, la inestabilidad de las lesiones ateroscleróticas avanzadas.
5. En placas ateroscleróticas humanas avanzadas, la reducción del ratio IRA/IRB, la disminución de la expresión del IGF-IR o el incremento del IGF-IIR podrían contribuir a la apoptosis y consecuente pérdida de VSMCs, favoreciendo la inestabilidad de la placa e incrementando el riesgo de rotura y sus consecuencias clínicas.

CONCLUSIÓN FINAL:

Esta tesis doctoral ha permitido establecer, por primera vez, que la isoforma A del receptor de insulina y el receptor de IGF-I tienen un papel diferencial en la aterosclerosis temprana y avanzada, pues favorecen la aterogénesis en las etapas iniciales mientras que previenen la inestabilidad y rotura de las placas ateroscleróticas avanzadas. Asimismo, la generación del modelo BATIRKO; ApoE^{-/-} nos ha permitido demostrar que la lipoatrofia marrón severa agrava el proceso aterosclerótico.

7. Bibliografía

- Aronson PI, Ward JPT, Connolly MJ. (2012). The cardiovascular system at a glance. 4^a ed. Oxford, Wiley-Blackwell.
- Abhijit S, Bhaskaran R, Narayanasamy A, Chakroborty A, Manickam N, Dixit M, Mohan V, Balasubramanyam M. (2013). Hyperinsulinemia-induced vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation is mediated by converging mechanisms of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Mol Cell Biochem* 373, 95-105.
- Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, José PA, Taylor SI, Westphal H. (1996). Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet* 12, 106-109.
- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 275, 9047-9054.
- Aikawa M, Libby P. (2004). The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol* 13, 125-138.
- Albaugh G, Bellavance E, Strande L, Heinburger S, Hewitt CW, Alexander JB. (2004). Nicotine induces mononuclear leukocyte adhesion and expression of adhesion molecules, VCAM and ICAM, in endothelial cells in vitro. *Ann Vasc Surg* 18, 302-307.
- An G, Wang H, Tang R, Yago T, McDaniel JM, McGee S, Huo Y, Xia L. (2008). P-selectin glycoprotein ligand-1 is highly expressed on Ly-6Chi monocytes and a major determinant for Ly-6Chi monocyte recruitment to sites of atherosclerosis in mice. *Circulation* 117, 3227-3237.
- Anderson CM, Henry RR, Knudson PE, Olefsky JM, Webster NJ. (1993). Relative expression of insulin receptor isoforms does not differ in lean, obese, and noninsulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 76, 1380-1382.
- Apovian CM, Bigornia S, Mott M, Meyers MR, Ulloor J, Gagua M, McDonnell M, Hess D, Joseph L, Gokce N. (2008). Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1654-1659.
- Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. (1994). Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372, 186-190.
- Arcaro A. (2013). Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor in human cancer. *Front Pharmacol* 4, 30.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Kumada M, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, *et al.* (2002). Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 105, 2893-2898.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, *et al.* (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 79-83.
- Badimon L, Vilahur G. (2014). Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med* 276, 618-632.
- Baillyes EM, Navé BT, Soos MA, Orr SR, Hayward AC, Siddle K. (1997). Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem J* 327, 209-215.
- Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. (1922). Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J* 12, 141-146.
- Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, *et al.* (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 17, 200-205.
- Bartness TJ, Ryu V. (2015). Neural control of white, beige and brown adipocytes. *Int J Obes Suppl* 5, S35-S39.
- Bartolomé A, Guillén C, Benito M. (2010). Role of the TSC1-TSC2 complex in the integration of insulin and glucose signaling involved in pancreatic beta-cell proliferation. *Endocrinology* 151, 3084-3094.
- Bauriedel G, Hutter R, Welsch U, Bach R, Sievert H, Lüderitz B. (1999). Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res* 41, 480-488.

- Beaty TH, Prenger VL, Virgil DG, Lewis B, Kwiterovich PO, Bachorik PS. (1992). A genetic model for control of hypertriglyceridemia and apolipoprotein B levels in the Johns Hopkins colony of St. Thomas Hospital rabbits. *Genetics* 132, 1095-1104.
- Becker K, Kindrick D, Relton J, Harlan J, Winn R. (2001). Antibody to the $\alpha 4$ integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32, 206-211.
- Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* 30, 586-623.
- Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, Zhang D, Cooksey RC, McClain DA, Litwin SE, *et al.* (2002). Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest* 109, 629-639.
- Benecke H, Flier JS, Moller DE. (1992). Alternatively spliced variants of the insulin receptor protein. Expression in normal and diabetic human tissues. *J Clin Invest* 89, 2066-2070.
- Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. (1995). Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 95, 2266-2274.
- Bennett MR, Sinha S, Owens GK. (2016). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res* 118, 692-702.
- Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* 114, 1852-1866.
- Berbée JF, Boon MR, Khedoe PP, Bartelt A, Schlein C, Worthmann A, Kooijman S, Hoeke G, Mol IM, John C, *et al.* (2015). Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat Commun* 6, 6356.
- Berg AH, Scherer PE. (2005). Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 96, 939-949.
- Bergman D, Halje M, Nordin M, Engström W. (2013). Insulin-like growth factor 2 in development and disease: a mini-review. *Gerontology* 59, 240-249.
- Björkerud S, Björkerud B. (1996). Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol* 149, 367-380.
- Björntorp P. (1991). Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 14, 1132-1143.
- Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR. (2002). Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 3, 25-38.
- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. (1998). Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894-897.
- Bornfeldt KE, Raines EW, Nakano T, Graves LM, Krebs EG, Ross R. (1994). Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest* 93, 1266-1274.
- Bornfeldt KE, Tabas I. (2011). Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell Metab* 14, 575-585.
- Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. (1999). Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J* 13, 1231-1238.
- Brown J, Jones EY, Forbes BE. (2009). Interactions of IGF-II with the IGF2R/cation-independent mannose-6-phosphate receptor mechanism and biological outcomes. *Vitam Horm* 80, 699-719.
- Brown NK, Zhou Z, Zhang J, Zeng R, Wu J, Eitzman DT, Chen YE, Chang L. (2014). Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 1621-1630.
- Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289, 2122-2125.
- Brüning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Hörsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR. (1998). A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2, 559-569.

- Brüning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR. (1997). Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell* 88, 561-572.
- Buchwalow IB, Podzuweit T, Bocker W, Samoilova VE, Thomas S, Wellner M, Baba HA, Robenek H, Schnekenburger J, Lerch MM. (2002). Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase. *FASEB J* 16, 500-508.
- Burke AP, Kolodgie FD, Zieske A, Fowler DR, Weber DK, Varghese PJ, Farb A, Virmani R. (2004). Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: a postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1266-1271.
- Cannon B, Nedergaard J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84, 277-359.
- Carey KD. (1978). Non-human primate models of atherosclerosis. En: Strong WB, ed. *Atherosclerosis: Its Pediatric Aspects*. Orlando Grune and Stratton, 41-83.
- Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV. (1996). Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348, 159-161.
- Chan PY, Aruffo A. (1993). VLA-4 integrin mediates lymphocyte migration on the inducible endothelial cell ligand VCAM-1 and the extracellular matrix ligand fibronectin. *J Biol Chem* 268, 24655-24664.
- Chang L, Milton H, Eitzman DT, Chen YE. (2013). Paradoxical roles of perivascular adipose tissue in atherosclerosis and hypertension. *Circ J* 77, 11-8.
- Chang L, Villacorta L, Li R, Hamblin M, Xu W, Dou C, Zhang J, Wu J, Zeng R, Chen YE. (2012). Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor- γ deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. *Circulation* 126, 1067-1078.
- Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G, Rothenberg FG, Neltner B, Romig-Martin SA, Dickson EW, *et al.* (2009). Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ Res* 104, 541-549.
- Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. (2003). Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 278, 45021-45026.
- Chen RJ, Wu HC, Chang MH, Lai CH, Tien YC, Hwang JM, Kuo WH, Tsai FJ, Tsai CH, Chen LM, *et al.* (2009). Leu271IGF2 plays an opposite role to IGF1 to induce H9c2 cardiomyoblast cell apoptosis via Galphaq signaling. *J Mol Endocrinol* 43, 221-230.
- Chen YC, Bui AV, Diesch J, Manasseh R, Hausding C, Rivera J, Haviv I, Agrotis A, Htun NM, Jowett J, *et al.* (2013). A novel mouse model of atherosclerotic plaque instability for drug testing and mechanistic/ therapeutic discoveries using gene and microRNA expression profiling. *Circ Res* 113, 252-265.
- Cheng HF, Becker BN, Burns KD, Harris RC. (1995). Angiotensin II upregulates type-1 angiotensin II receptors in renal proximal tubule. *J Clin Invest* 95, 2012-2019.
- Chinetti-Gbaguidi G, Colin S, Staels B. (2015). Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 12, 10-7.
- Chisalita SI, Arnqvist HJ. (2005). Expression and function of receptors for insulin-like growth factor-I and insulin in human coronary artery smooth muscle cells. *Diabetologia*. 48, 2155-2161.
- Cho A, Reidy MA. (2002). Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ Res* 91, 845-851.
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. (2001). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292, 1728-1731.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Chu CH, Tzang BS, Chen LM, Kuo CH, Cheng YC, Chen LY, Tsai FJ, Tsai CH, Kuo WW, Huang CY. (2008). IGF-II/mannose-6-phosphate receptor signaling induced cell hypertrophy and atrial natriuretic peptide/BNP expression via Galphaq interaction and protein kinase C-alpha/CaMKII activation in H9c2 cardiomyoblast cells. *J Endocrinol* 197, 381-390.
- Chu CH, Tzang BS, Chen LM, Liu CJ, Tsai FJ, Tsai CH, Lin JA, Kuo WW, Bau DT, Yao CH, Huang CY. (2009). Activation of insulin-like growth factor II receptor induces mitochondrial-dependent apoptosis through G(alpha)q and downstream calcineurin signaling in myocardial cells. *Endocrinology* 150, 2723-2731.

- Cinti S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E977-E986.
- Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazia M, De Cesare D, Iezzi A, Uchino S, Boccoli G, Saba V, *et al.* (2001). Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation* 104, 921-927.
- Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, Bennett MR. (2006). Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med* 12, 1075-1080.
- Clarke MC, Littlewood TD, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Bennett MR. (2008). Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ Res* 102, 1529-1538.
- Cohick WS, Clemmons DR. (1993). The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 55, 131-153.
- Cohn JN, Tognoni G. (2001). A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 345, 1667-1675.
- Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. (2000). P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 191, 189-194.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, *et al.* (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360, 1509-1517.
- Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N. (1999). Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 143, 205-211.
- DeCaprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee WH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54, 275-283.
- Denley A, Bonython ER, Booker GW, Cosgrove LJ, Forbes BE, Ward CW, Wallace JC. (2004). Structural determinants for high-affinity binding of insulin-like growth factor II to insulin receptor (IR)-A, the exon 11 minus isoform of the IR. *Mol Endocrinol* 18, 2502-2512.
- Denley A, Wallace JC, Cosgrove LJ, Forbes BE. (2003). The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review. *Horm Metab Res* 35, 778-785.
- Dichek D, Quertermous T. (1989). Thrombin regulation of mRNA levels of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 74, 222-228.
- Duan C, Bauchat JR, Hsieh T. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res* 86, 15-23.
- Dzau VJ. (2001). Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension* 37, 1047-1052.
- Emeis JJ, Kooistra T. (1986). Interleukin 1 and lipopolysaccharide induce an inhibitor of tissue-type plasminogen activator in vivo and in cultured endothelial cells. *J Exp Med* 163, 1260-1266.
- Escaned J, de Jong M, Violaris AG, MacLeod DC, Umans VA, van Suylen RJ, de Feyter PJ, Verdouw PD, Serruys PW. (1993). Clinical and histological determinants of smooth-muscle cell outgrowth in cultured atherectomy specimens: importance of thrombus organization. *Coron Artery Dis* 4, 883-890.
- Escribano O, Guillén C, Nevado C, Gómez-Hernández A, Kahn CR, Benito M. (2009). Beta-Cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform. *Diabetes* 58, 820-828.
- Fan J, McCormick SP, Krauss RM, Taylor S, Quan R, Taylor JM, Young SG. (1995). Overexpression of human apolipoprotein B-100 in transgenic rabbits results in increased levels of LDL and decreased levels of HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1889-1899.
- Faries PL, Rohan DI, Takahara H, Wyers MC, Contreras MA, Quist WC, King GL, Logerfo FW. (2001). Human vascular smooth muscle cells of diabetic origin exhibit increased proliferation, adhesion, and migration. *J Vasc Surg* 33, 601-607.
- Fayad ZA, Fuster V. (2001). Clinical imaging of the high-risk or vulnerable atherosclerotic plaque. *Circ Res* 89, 305-316.
- Fernández ML, Volek JS. (2006). Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutr Metab (Lond)* 3, 17.

- Föger B, Chase M, Amar MJ, Vaisman BL, Shamburek RD, Paigen B, Fruchart-Najib J, Paiz JA, Koch CA, Hoyt RF, *et al.* (1999). Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *J Biol Chem* 274, 36912-36920.
- Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H. (1998). Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 12, 773-790.
- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23, 1121-1131.
- Förstermann U, Sessa WC. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33, 829-837.
- Foti D, Chiefari E, Fedele M, Iuliano R, Brunetti L, Paonessa F, Manfioletti G, Barbetti F, Brunetti A, Croce CM, *et al.* (2005). Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice. *Nat Med* 11, 765-773.
- Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R. (1999). Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol* 19, 3278-3288.
- Fratтали AL, Pessin JE. (1993). Relationship between alpha subunit ligand occupancy and beta subunit autophosphorylation in insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors. *J Biol Chem* 268, 7393-7400.
- G**alis ZS, Khatri JJ. (2002). Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90, 251-262.
- Galis ZS, Sukhova GK, Kranzhöfer R, Clark S, Libby P. (1995). Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 402-406.
- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94, 2493-2503.
- Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR, *et al.* (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* 112, 197-208.
- Geer JC, Guitry MA. (1965). Experimental canine atherosclerosis. En: Roberts JC, Straus R, eds. *Comparative atherosclerosis*. Hoeber, Harper and Row, New York, 170-185.
- Geng YJ, Libby P. (1995). Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am J Pathol* 147, 251-266.
- Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131, 242-256.
- Getz GS, Reardon CA. (2012). Animal models of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 1104-1115.
- Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 202-212.
- Gil-Ortega M, Somoza B, Huang Y, Gollasch M, Fernández-Alfonso MS. (2015). Regional differences in perivascular adipose tissue impacting vascular homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 26, 367-375.
- Girnita A, Girnita L, del Prete F, Bartolazzi A, Larsson O, Axelson M. (2004). Cyclolignans as inhibitors of the insulin-like growth factor-1 receptor and malignant cell growth. *Cancer Res* 64, 236-242.
- Gjoerup O, Chao H, DeCaprio JA, Roberts TM. (2000). pRB-dependent, J domain-independent function of simian virus 40 large T antigen in override of p53 growth suppression. *J Virol* 74, 864-874.
- Glass CK, Witztum JL. (2001). Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 104, 503-516.
- Gockerman A, Prevette T, Jones JI, Clemmons DR. (1995). Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins inhibit the smooth muscle cell migration responses to IGF-I and IGF-II. *Endocrinology* 136, 4168-4173.
- Gómez-Hernández A, Escribano Ó, Perdomo L, Otero YF, García-Gómez G, Fernández S, Benoit N, Benito M. (2013). Implication of insulin receptor A isoform and IRA/IGF-IR hybrid receptors in the aortic vascular smooth muscle cell proliferation: role of TNF- α and IGF-II. *Endocrinology* 154, 2352-2364.

- Gómez-Hernández A, Otero YF, de las Heras N, Escribano Ó, Cachofeiro V, Lahera V, Benito M. (2012). Brown fat lipoatrophy and increased visceral adiposity through a concerted adipocytokines overexpression induces vascular insulin resistance and dysfunction. *Endocrinology* 153, 1242-1255.
- Greeve J, Altkemper I, Dieterich JH, Greten H, Windler E. (1993). Apolipoprotein B mRNA editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res* 34, 1367-1383.
- Griendling KK, FitzGerald GA. (2003). Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108, 1912-1916.
- Groot PH, van Vlijmen BJ, Benson GM, Hofker MH, Schiffelers R, Vidgeon-Hart M, Havekes LM. (1996). Quantitative assessment of aortic atherosclerosis in APOE*3 Leiden transgenic mice and its relationship to serum cholesterol exposure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 926-933.
- Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2, 275-281.
- Guerra C, Navarro P, Valverde AM, Arribas M, Brüning J, Kozak LP, Kahn CR, Benito M. (2001). Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest* 108, 1205-1213.
- Hammad A, Assali A, Fuchs S, Battler A, Kornowski R. (2007). Imaging of vulnerable coronary artery plaques. *Catheter Cardiovasc Interv* 70, 65-74.
- Han DK, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Liao G. (1995). Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* 147, 267-277.
- Han Y, Runge MS, Brasier AR. (1999). Angiotensin II induces interleukin-6 transcription in vascular smooth muscle cells through pleiotropic activation of nuclear factor-kappa B transcription factors. *Circ Res* 84, 695-703.
- Hansen T, Bjørbaek C, Vestergaard H, Grønskov K, Bak JF, Pedersen O. (1993). Expression of insulin receptor spliced variants and their functional correlates in muscle from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 1500-1505.
- Hara K, Yonezawa K, Kozlowski MT, Sugimoto T, Andrabi K, Weng QP, Kasuga M, Nishimoto I, Avruch J. (1997). Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem* 272, 26457-26463.
- Harms M, Seale P. (2013). Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 19, 1252-1263.
- Harris LK, Westwood M. (2012). Biology and significance of signalling pathways activated by IGF-II. *Growth Factors* 30, 1-12.
- Hartvigsen K, Binder CJ, Hansen LF, Rafia A, Juliano J, Hökkö S, Steinberg D, Palinski W, Witztum JL, Li AC. (2007). A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 878-885.
- Hawkes C, Jhamandas JH, Harris KH, Fu W, MacDonald RG, Kar S. (2006). Single transmembrane domain insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor regulates central cholinergic function by activating a G-protein-sensitive, protein kinase C-dependent pathway. *J Neurosci* 26, 585-596.
- Hébert E. (2006). Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor expression and tumor development. *Biosci Rep* 26, 7-17.
- Hernández-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J. (1997). Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 95, 1532-1541.
- Hernández-Sánchez C, Mansilla A, de Pablo F, Zardoya R. (2008). Evolution of the insulin receptor family and receptor isoform expression in vertebrates. *Mol Biol Evol* 25, 1043-1053.
- Higashi Y, Peng T, Du J, Sukhanov S, Li Y, Itabe H, Parthasarathy S, Delafontaine P. (2005). A redox-sensitive pathway mediates oxidized LDL-induced downregulation of insulin-like growth factor-1 receptor. *J Lipid Res* 46, 1266-1277.
- Higashi Y, Quevedo HC, Tiwari S, Sukhanov S, Shai SY, Anwar A, Delafontaine P. (2014). Interaction between insulin-like growth factor-1 and atherosclerosis and vascular aging. *Front Horm Res* 43, 107-124.

- Higashi Y, Sukhanov S, Shai SY, Danchuk S, Tang R, Snarski P, Li Z, Lobelle-Rich P, Wang M, Wang D, *et al.* (2016). Insulin-like growth factor 1 receptor deficiency in macrophages accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in Apolipoprotein E deficient mice. *Circulation* 133, 2263-2278.
- Hollander W, Kirkpatrick B, Paddock J, Colombo M, Nagraj S, Prusty S. (1979). Studies on the progression and regression of coronary and peripheral atherosclerosis in the cynomolgus monkey. I. Effects of dipyridamole and aspirin. *Exp Mol Pathol* 30, 55-73.
- Hondares E, Iglesias R, Giralt A, Gonzalez FJ, Giralt M, Mampel T, Villarroya F. (2011). Thermogenic activation induces FGF21 expression and release in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 286, 12983-12990.
- Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. (1994). Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4854-4858.
- Hotamisligil GS. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-867.
- Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, *et al.* (2000). Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1595-1599.
- Hribal ML, Perego L, Lovari S, Andreozzi F, Menghini R, Perego C, Finzi G, Usellini L, Placidi C, Capella C, *et al.* (2003). Chronic hyperglycemia impairs insulin secretion by affecting insulin receptor expression, splicing, and signaling in RIN beta cell line and human islets of Langerhans. *FASEB J* 17, 1340-1342.
- Hubbard AK, Rothlein R. (2000). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic Biol Med* 28, 1379-1386.
- Hynes RO. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, Ishibashi M, Hiasa K, Nishida K, Takeshita A. (2002). Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 106, 2700-2706.
- International Diabetes Federation (2015). IDF Diabetes Atlas, 7^a ed. Bruselas, Bélgica. International Diabetes Federation. Disponible en <http://www.diabetesatlas.org>
- Item F, Konrad D. (2012). Visceral fat and metabolic inflammation: the portal theory revisited. *Obes Rev* 13, 30-39.
- Jacene HA, Cohade CC, Zhang Z, Wahl RL. (2011). The relationship between patients' serum glucose levels and metabolically active brown adipose tissue detected by PET/CT. *Mol Imaging Biol* 13, 1278-1283.
- Jia G, Cheng G, Agrawal DK. (2006). Differential effects of insulin-like growth factor-1 and atheroma-associated cytokines on cell proliferation and apoptosis in plaque smooth muscle cells of symptomatic and asymptomatic patients with carotid stenosis. *Immunol Cell Biol* 84, 422-429.
- Jia G, Cheng G, Soundararajan K, Agrawal DK. (2007). Insulin-like growth factor-I receptors in atherosclerotic plaques of symptomatic and asymptomatic patients with carotid stenosis: effect of IL-12 and IFN-gamma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H1051-H1057.
- Johansson GS, Arnqvist HJ. (2006). Insulin and IGF-I action on insulin receptors, IGF-I receptors, and hybrid insulin/IGF-I receptors in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E1124-E1130.
- Johnson C, Galis ZS. (2004). Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 54-60.
- Johnson JL. (2014). Emerging regulators of vascular smooth muscle cell function in the development and progression of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 103, 452-460.
- Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthieux E, Jami J, Bucchini D. (1996). Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J* 15, 1542-1547.
- Kalli KR, Falowo OI, Bale LK, Zschunke MA, Roche PC, Conover CA. (2002). Functional insulin receptors on human epithelial ovarian carcinoma cells: implications for IGF-II mitogenic signaling. *Endocrinology* 143, 3259-3267.

- Kasuga M, Fujita-Yamaguchi Y, Blithe DL, White MF, Kahn CR. (1983). Characterization of the insulin receptor kinase purified from human placental membranes. *J Biol Chem* 258, 10973-10980.
- Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ. (1995). Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* 377, 151-155.
- Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R. (2004). Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun* 314, 415-419.
- Kellerer M, Sesti G, Seffer E, Obermaier-Kusser B, Pongratz DE, Mosthaf L, Häring HU. (1993). Altered pattern of insulin receptor isotypes in skeletal muscle membranes of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects. *Diabetologia* 36, 628-632.
- Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG. (1996). Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 28, 619-637.
- Khimji AK, Rockey DC. (2010). Endothelin-biology and disease. *Cell Signal* 22, 1615-1625.
- Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF, Accili D. (2000). Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. *J Clin Invest* 105, 199-205.
- Kikuchi-Utsumi K, Gao B, Ohinata H, Hashimoto M, Yamamoto N, Kuroshima A. (2002). Enhanced gene expression of endothelial nitric oxide synthase in brown adipose tissue during cold exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R623-R626.
- Kim SH, Plutzky J. (2016). Brown Fat and Browning for the Treatment of Obesity and Related Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J* 40, 12-21.
- Kitamura T, Kahn CR, Accili D. (2003). Insulin receptor knockout mice. *Annu Rev Physiol* 65, 313-332.
- Kohanski RA. (1993). Insulin receptor autophosphorylation. I. Autophosphorylation kinetics of the native receptor and its cytoplasmic kinase domain. *Biochemistry* 32, 5766-5772.
- Kohler HP, Grant PJ. (2000). Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 342, 1792-1801.
- Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Gold HK, Yuan J, Narula J, Finn AV, Virmani R. (2001). The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol* 16, 285-292.
- Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma KI, Saito M, Suzuki-Miura T, Wang Z, Sato Y, Mori N, Yamashita H. (2005). UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell* 4, 147-155.
- Kranendonk ME, van Herwaarden JA, Stupkova T, de Jager W, Vink A, Moll FL, Kalkhoven E, Visseren FL. (2015). Inflammatory characteristics of distinct abdominal adipose tissue depots relate differently to metabolic risk factors for cardiovascular disease: distinct fat depots and vascular risk factors. *Atherosclerosis* 239, 419-427.
- Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, et al. (2000). Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49, 1880-1889.
- Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. (1999). Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 96, 329-339.
- Kuzuya M, Kanda S, Sasaki T, Tamaya-Mori N, Cheng XW, Itoh T, Itohara S, Iguchi A. (2003). Deficiency of gelatinase A suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia. *Circulation* 108, 1375-1381.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lau MM, Stewart CE, Liu Z, Bhatt H, Rotwein P, Stewart CL. (1994). Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev* 8, 2953-2963.
- Lauro D, Kido Y, Castle AL, Zarnowski MJ, Hayashi H, Ebina Y, Accili D. (1998). Impaired glucose tolerance in mice with a targeted impairment of insulin action in muscle and adipose tissue. *Nat Genet* 20, 294-298.

- Lee SD, Chu CH, Huang EJ, Lu MC, Liu JY, Liu CJ, Hsu HH, Lin JA, Kuo WW, Huang CY. (2006). Roles of insulin-like growth factor II in cardiomyoblast apoptosis and in hypertensive rat heart with abdominal aorta ligation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E306-E314.
- Leppänen P, Luoma JS, Hofker MH, Havekes LM, Ylä-Herttuala S. (1998). Characterization of atherosclerotic lesions in apo E3-leiden transgenic mice. *Atherosclerosis* 136, 147-152.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-689.
- Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. (1993). An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 13, 197-204.
- Li Y, Higashi Y, Itabe H, Song YH, Du J, Delafontaine P. (2003). Insulin-like growth factor-1 receptor activation inhibits oxidized LDL-induced cytochrome C release and apoptosis via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2178-2184.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317-325.
- Libby P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.
- Lim HJ, Park HY, Ko YG, Lee SH, Cho SY, Lee EJ, Jameson JL, Jang Y. (2004). Dominant negative insulin-like growth factor-1 receptor inhibits neointimal formation through suppression of vascular smooth muscle cell migration and proliferation, and induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 1106-1114.
- Lin KH, Kuo CH, Kuo WW, Ho TJ, Pai P, Chen WK, Pan LF, Wang CC, Padma VV, Huang CY. (2015). NFIL3 suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death by targeting the insulin-like growth factor 2 receptor. *J Cell Biochem* 116, 1113-1120.
- Lingohr MK, Buettner R, Rhodes CJ. (2002). Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends Mol Med* 8, 375-384.
- Littlewood TD, Bennett MR. (2003). Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 14, 469-475.
- Lönnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. (1995). Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med* 1, 950-953.
- Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, Kozak LP, Flier JS. (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366, 740-742.
- Ma XM, Blenis J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 307-318.
- Malaguarnera R, Belfiore A. (2011). The insulin receptor: a new target for cancer therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2, 93.
- Martí A, Berraondo B, Martínez JA. (1999). Leptin: physiological actions. *J Physiol Biochem* 55, 43-49.
- Martín-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. (2000). Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell Immunol* 199, 15-24.
- Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Gómez-Hernández A, Arribas A, Ortega L, Tuñón J, Egido J. (2004). NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke* 35, 458-463.
- Mathieu P, Lemieux I, Després JP. (2010). Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Clin Pharmacol Ther* 87, 407-416.
- McEver RP. (2015). Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signaling at the vascular wall. *Cardiovasc Res* 107, 331-339.
- McKinnon T, Chakraborty C, Gleeson LM, Chidiac P, Lala PK. (2001). Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 3665-3674.
- McMillan AC, White MD. (2015). Induction of thermogenesis in brown and beige adipose tissues: molecular markers, mild cold exposure and novel therapies. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 22, 347-352.

- Menting JG, Lawrence CF, Kong GK, Margetts MB, Ward CW, Lawrence MC. (2015). Structural Congruency of Ligand Binding to the Insulin and Insulin/Type 1 Insulin-like Growth Factor Hybrid Receptors. *Structure* 23, 1271-1282.
- Miao CY, Li ZY. (2012). The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol* 165, 643-658.
- Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR. (2000). Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6, 87-97.
- Moller DE, Yokota A, Caro JF, Flier JS. (1989). Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol* 3, 1263-1269.
- Morimoto S, Cassell MD, Sigmund CD. (2002). The brain renin-angiotensin system in transgenic mice carrying a highly regulated human renin transgene. *Circ Res* 90, 80-86.
- Morino K, Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Frattini J, Shatzkes N, Neschen S, White MF, Bilz S, Sono S, *et al.* (2005). Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* 115, 3587-3593.
- Mosthaf L, Grako K, Dull TJ, Coussens L, Ullrich A, McClain DA. (1990). Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J* 9, 2409-2413.
- Mosthaf L, Vogt B, Häring HU, Ullrich A. (1991). Altered expression of insulin receptor types A and B in the skeletal muscle of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4728-4730.
- Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ. (2004). Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 264-271.
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. (1993). PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 178, 449-460.
- Murray CJ, Lopez AD. (2013). Measuring the global burden of disease. *N Engl J Med* 369, 448-457.
- Myatt SS, Lam EW. (2007). The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 847-859.
- Myers MG Jr, Backer JM, Sun XJ, Shoelson S, Hu P, Schlessinger J, Yoakim M, Schaffhausen B, White MF. (1992). IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10350-10354.
- Naito M, Hayashi T, Kuzuya M, Funaki C, Asai K, Kuzuya F. (1990). Effects of fibrinogen and fibrin on the migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Atherosclerosis* 83, 9-14.
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14, 133-140.
- Nakata M, Yada T, Soejima N, Maruyama I. (1999). Leptin promotes aggregation of human platelets via the long form of its receptor. *Diabetes* 48, 426-429.
- Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Tamura M, Tasaki H, Morishita T, Suda O, Ueno S, Toyohira Y, Nakashima Y, Yanagihara N. (2005). Vascular neuronal NO synthase is selectively upregulated by platelet-derived growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2502-2508.
- Newby AC. (2006). Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 69, 614-624.
- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, Biryukov S, Abbafati C, Abera SF, *et al.* (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 384, 766-781.
- Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ. (2006). Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocr Rev* 27, 242-259.
- Nistor A, Bulla A, Filip DA, Radu A. (1987). The hyperlipidemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 68, 159-173.
- Nitert MD, Chisalita SI, Olsson K, Bornfeldt KE, Arnqvist HJ. (2005). IGF-I/insulin hybrid receptors in human endothelial cells. *Mol Cell Endocrinol* 229, 31-37.

- Norgren S, Zierath J, Galuska D, Wallberg-Henriksson H, Luthman H. (1993). Differences in the ratio of RNA encoding two isoforms of the insulin receptor between control and NIDDM patients. The RNA variant without Exon 11 predominates in both groups. *Diabetes* 42, 675-681.
- Okamoto E, Couse T, De Leon H, Vinten-Johansen J, Goodman RB, Scott NA, Wilcox JN. (2001). Perivascular inflammation after balloon angioplasty of porcine coronary arteries. *Circulation* 104, 2228-2235.
- Okamoto T, Nishimoto I. (1991). Analysis of stimulation-G protein subunit coupling by using active insulin-like growth factor II receptor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8020-8023.
- Okura Y, Brink M, Zahid AA, Anwar A, Delafontaine P. (2001). Decreased expression of insulin-like growth factor-1 and apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaque. *J Mol Cell Cardiol* 33, 1777-1789.
- Olson TS, Bamberger MJ, Lane MD. (1988). Post-translational changes in tertiary and quaternary structure of the insulin proreceptor. Correlation with acquisition of function. *J Biol Chem* 263, 7342-7351.
- Omar A, Chatterjee TK, Tang Y, Hui DY, Weintraub NL. (2014). Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 1631-1636.
- Oparil S, Haber E. (1974a). The renin-angiotensin system (first of two parts). *N Engl J Med* 291, 389-401.
- Oparil S, Haber E. (1974b). The renin-angiotensin system (second of two parts). *N Engl J Med* 291, 446-457.
- Organización Mundial de la Salud. (2016a). Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva N°311. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Organización Mundial de la Salud. (2016b). Cifras y datos: 10 datos sobre la obesidad. Disponible en <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/>
- Ou JM, Lian WS, Qiu MK, Dai YX, Dong Q, Shen J, Dong P, Wang XF, Liu YB, Quan ZW, Fei ZW. (2014). Knockdown of IGF2R suppresses proliferation and induces apoptosis in hemangioma cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 45, 1241-1249.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, et al. (2001). Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103, 1057-1063.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, et al. (2000). Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102, 1296-1301.
- Ozen G, Daci A, Norel X, Topal G. (2015). Human perivascular adipose tissue dysfunction as a cause of vascular disease: Focus on vascular tone and wall remodeling. *Eur J Pharmacol* 766, 16-24.
- Padilla J, Jenkins NT, Vieira-Potter VJ, Laughlin MH. (2013). Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304, R543-R552.
- Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. (2002). Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem* 277, 39684-39695.
- Pandini G, Vigneri R, Costantino A, Frasca F, Ippolito A, Fujita-Yamaguchi Y, Siddle K, Goldfine ID, Belfiore A. (1999). Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor overexpression in breast cancers leads to insulin/IGF-I hybrid receptor overexpression: evidence for a second mechanism of IGF-I signaling. *Clin Cancer Res* 5, 1935-1944.
- Parhami F, Tintut Y, Ballard A, Fogelman AM, Demer LL. (2001). Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circ Res* 88, 954-960.
- Park CS, Park R, Krishna G. (1996). Constitutive expression and structural diversity of inducible isoform of nitric oxide synthase in human tissues. *Life Sci* 59, 219-225.
- Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang Y, Cho SY, Kim HS. (2001). Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med* 33, 95-102.

- Patel VA, Zhang QJ, Siddle K, Soos MA, Goddard M, Weissberg PL, Bennett MR. (2001). Defect in insulin-like growth factor-1 survival mechanism in atherosclerotic plaque-derived vascular smooth muscle cells is mediated by reduced surface binding and signaling. *Circ Res* 88, 895-902.
- Payne GA, Tune JD, Knudson JD. (2014). Leptin-induced endothelial dysfunction: a target for therapeutic interventions. *Curr Pharm Des* 20, 603-608.
- Peirce V, Vidal-Puig A. (2013). Regulation of glucose homeostasis by brown adipose tissue. *Lancet Diabetes Endocrinol* 1, 353-360.
- Pernow J, Shemyakin A, Böhm F. (2012). New perspectives on endothelin-1 in atherosclerosis and diabetes mellitus. *Life Sci* 91, 507-516.
- Pfeifer A, Hoffmann LS. (2015). Brown, beige, and white: the new color code of fat and its pharmacological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 55, 207-227.
- Phillips MI, Sumners C. (1998). Angiotensin II in central nervous system physiology. *Regul Pept* 78, 1-11.
- Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. (2004). Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 291, 1730-1737.
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343-353.
- Pober JS, Sessa WC. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 7, 803-815.
- Poekes L, Lanthier N, Leclercq IA. (2015). Brown adipose tissue: a potential target in the fight against obesity and the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)* 129, 933-949.
- Polanco JI, Berciano MT, Lafarga M, León J, Pocoví M, Rodríguez-Rey JC. (1995). Expression of insulin-like growth factor receptor mRNA in rabbit atherosclerotic lesions. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 182-190.
- Pouyssegur J, Volmat V, Lenormand P. (2002). Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol* 64, 755-763.
- Prentki M, Nolan CJ. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116, 1802-1812.
- Prescott MF, McBride CH, Hasler-Rapacz J, Von Linden J, Rapacz J. (1991). Development of complex atherosclerotic lesions in pigs with inherited hyper-LDL cholesterolemia bearing mutant alleles for apolipoprotein B. *Am J Pathol* 139, 139-147.
- Price DT, Loscalzo J. (1999). Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 107, 85-97.
- Quehenberger P, Exner M, Sunder-Plassmann R, Ruzicka K, Bieglmayer C, Endler G, Muellner C, Speiser W, Wagner O. (2002). Leptin induces endothelin-1 in endothelial cells in vitro. *Circ Res* 90, 711-718.
- Rask-Madsen C, King GL. (2013). Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab* 17, 20-33.
- Rask-Madsen C, Li Q, Freund B, Feather D, Abramov R, Wu IH, Chen K, Yamamoto-Hiraoka J, Goldenbogen J, Sotiropoulos KB, et al. (2010). Loss of insulin signaling in vascular endothelial cells accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E null mice. *Cell Metab* 11, 379-389.
- Rittig K, Dolderer JH, Balletshofer B, Machann J, Schick F, Meile T, Küper M, Stock UA, Staiger H, Machicao F, et al. (2012). The secretion pattern of perivascular fat cells is different from that of subcutaneous and visceral fat cells. *Diabetologia* 55, 1514-1525.
- Rodríguez A, Becerril S, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Frühbeck G. (2017). Cross-talk between adipokines and myokines in fat browning. *Acta Physiol (Oxf)* 219, 362-381.
- Ross R. (1999). Atherosclerosis, an inflammatory disease. *N Eng J Med* 340, 115-126.
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J. (2001). Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension* 38, 1382-1387.
- Sacco A, Morcavallo A, Pandini G, Vigneri R, Belfiore A. (2009). Differential signaling activation by insulin and insulin-like growth factors I and II upon binding to insulin receptor isoform A. *Endocrinology* 150, 3594-3602.

- Saini V. (2010). Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* 1, 68-75.
- Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K, *et al.* (2009). High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58, 1526-1531.
- Samuel VT, Shulman GI. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148, 852-871.
- Sanan DA, Newland DL, Tao R, Marcovina S, Wang J, Mooser V, Hammer RE, Hobbs HH. (1998). Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4544-4549.
- Sánchez-Delgado G, Martínez-Tellez B, Olza J, Aguilera CM, Gil Á, Ruiz JR. (2015). Role of exercise in the activation of brown adipose tissue. *Ann Nutr Metab* 67, 21-32.
- Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. (1999). Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 194, 6-11.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.
- Sata M, Fukuda D. (2010). Crucial role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Med Invest* 57, 12-25.
- Sawdey M, Podor TJ, Loskutoff DJ. (1989). Regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in cultured bovine aortic endothelial cells. Induction by transforming growth factor-beta, lipopolysaccharide, and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 264, 10396-10401.
- Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, Zhang H, Townsend KL, Shadrach JL, Cerletti M, McDougall LE, Giorgadze N, Tchkonja T, *et al.* (2011). Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 143-148.
- Schwartz SM, Galis ZS, Rosenfeld ME, Falk E. (2007). Plaque rupture in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 705-713.
- Sciacca L, Costantino A, Pandini G, Mineo R, Frasca F, Scalia P, Sbraccia P, Goldfine ID, Vigneri R, Belfiore A. (1999). Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene* 18, 2471-2479.
- Sciacca L, Mineo R, Pandini G, Murabito A, Vigneri R, Belfiore A. (2002). In IGF-I receptor-deficient leiomyosarcoma cells autocrine IGF-II induces cell invasion and protection from apoptosis via the insulin receptor isoform A. *Oncogene* 21, 8240-8250.
- Seino S, Bell GI. (1989). Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 159, 312-316.
- Sesti G, Marini MA, Tullio AN, Montemurro A, Borboni P, Fusco A, Accili D, Lauro R. (1991). Altered expression of the two naturally occurring human insulin receptor variants in isolated adipocytes of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 1419-1424.
- Sesti G, Tullio AN, Marini MA, Manera E, Borboni P, Accili D, Longhi R, Fusco A, Lauro R, Montemurro A. (1994). Role of the exon 11 of the insulin receptor gene on insulin binding identified by anti-peptide antibodies. *Mol Cell Endocrinol* 101, 121-127.
- Shai S, Sukhanov S, Higashi Y, Vaughn C, Kelly J, Delafontaine P. (2010). Smooth muscle cell-specific insulin-like growth factor-1 overexpression in Apoe^{-/-} mice does not alter atherosclerotic plaque burden but increases features of plaque stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1916-1924.
- Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, Hu H, Wang L, Pavlova Z, Gilsanz V, Kajimura S. (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 7, e49452.
- Shimasaki S, Ling N. (1991). Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog Growth Factor Res* 3, 243-266.
- Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, Yamashita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, *et al.* (1996). Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med* 2, 800-803.

- Shin HJ, Oh J, Kang SM, Lee JH, Shin MJ, Hwang KC, Jang Y, Chung JH. (2005). Leptin induces hypertrophy via p38 mitogen-activated protein kinase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 18-24.
- Shiomi M, Ito T. (2009). The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: a tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe. *Atherosclerosis* 207, 1-7.
- Siddle K. (2011). Signaling by insulin and IGF receptor: supporting acts and new player. *J Mol Endocrinol* 47, R1-R10.
- Sidossis LS, Porter C, Saraf MK, Børshiem E, Radhakrishnan RS, Chao T, Ali A, Chondronikola M, Mlcek R, Finnerty CC, et al. (2015). Browning of subcutaneous white adipose tissue in humans after severe adrenergic stress. *Cell Metab* 22, 219-227.
- Silvestre-Roig C, de Winther MP, Weber C, Daemen MJ, Lutgens E, Soehnlein O. (2014). Atherosclerotic plaque destabilization: mechanisms, models, and therapeutic strategies. *Circ Res* 114, 214-226.
- Smith EB, Cochran S. (1990). Factors influencing the accumulation in fibrous plaques of lipid derived from low density lipoprotein. II. Preferential immobilization of lipoprotein (a) (Lp(a)). *Atherosclerosis* 84, 173-181.
- Soos MA, Siddle K. (1989). Immunological relationships between receptors for insulin and insulin-like growth factor I. Evidence for structural heterogeneity of insulin-like growth factor I receptors involving hybrids with insulin receptors. *Biochem J* 263, 553-563.
- Sornelli F, Fiore M, Chaldakov GN, Aloe L. (2009). Adipose tissue-derived nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor: results from experimental stress and diabetes. *Gen Physiol Biophys* 28, 179-183.
- Spinetti G, Wang M, Monticone R, Zhang J, Zhao D, Lakatta EG. (2004). Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1397-1402.
- Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, Markan KR, Nakano K, Hirshman MF, Tseng YH, Goodyear LJ. (2013). Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 123, 215-223.
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92, 1355-1374.
- Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb* 14, 840-856.
- Steinberg D, Witztum JL. (2010). Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 2311-2316.
- Steinberg, D. (1997). Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95, 1062-1071.
- Steiner DF, Park SY, Støy J, Philipson LH, Bell GI. (2009). A brief perspective on insulin production. *Diabetes Obes Metab* 11, 189-196.
- Stenbit AE, Tsao TS, Li J, Burcelin R, Geenen DL, Factor SM, Houseknecht K, Katz EB, Charron MJ. (1997). GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med* 3, 1096-1101.
- Stout RW. (1991). Insulin as a mitogenic factor: role in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am J Med* 90, 62S-65S.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. (2005). Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365, 1333-1346.
- Swerlick RA, Lee KH, Li LJ, Sepp NT, Caughman SW, Lawley TJ. (1992). Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J Immunol* 149, 698-705.
- T**abas I, Williams KJ, Borén J. (2007). Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* 116, 1832-1844.
- Taguchi A, White MF. (2008). Insulin-like signaling, nutrient homeostasis, and life span. *Annu Rev Physiol* 70, 191-212.

- Takaoka M, Suzuki H, Shioda S, Sekikawa K, Saito Y, Nagai R, Sata M. (2010). Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1576-1582.
- Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, *et al.* (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372, 182-186.
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 85-96.
- Taylor SI, Accili D, Imai Y. (1994). Insulin resistance or insulin deficiency. Which is the primary cause of NIDDM? *Diabetes* 43, 735-740.
- Tonello C, Giordano A, Cozzi V, Cinti S, Stock MJ, Carruba MO, Nisoli E. (1999). Role of sympathetic activity in controlling the expression of vascular endothelial growth factor in brown fat cells of lean and genetically obese rats. *FEBS Lett* 442, 167-172.
- Tsutsui M. (2004). Neuronal nitric oxide synthase as a novel anti-atherogenic factor. *J Atheroscler Thromb* 11, 41-48.
- Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. (1999). Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation* 100, 1223-1229.
- Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, *et al.* (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5, 2503-2512.
- Van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. (2011). Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 91, 79-118.
- van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. (1994). Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 89, 36-44.
- Van Harmelen V, Ariapart P, Hoffstedt J, Lundkvist I, Bringman S, Arner P. (2000). Increased adipose angiotensinogen gene expression in human obesity. *Obes Res* 8, 337-341.
- van Vlijmen BJ, van den Maagdenberg AM, Gijbels MJ, van der Boom H, HogenEsch H, Frants RR, Hofker MH, Havekes LM. (1994). Diet-induced hyperlipoproteinemia and atherosclerosis in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *J Clin Invest* 93, 1403-1410.
- Vasilcanu D, Girnita A, Girnita L, Vasilcanu R, Axelson M, Larsson O. (2004). The cyclolignan PPP induces activation loop-specific inhibition of tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor. Link to the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt apoptotic pathway. *Oncogene* 3, 7854-7862.
- Vaughan DE, Lazos SA, Tong K. (1995). Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis. *J Clin Invest* 95, 995-1001.
- Vaughan DE. (2005). PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 3, 1879-1883.
- Vella V, Pandini G, Sciacca L, Mineo R, Vigneri R, Pezzino V, Belfiore A. (2002). A novel autocrine loop involving IGF-II and the insulin receptor isoform-A stimulates growth of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 245-254.
- Véniant MM, Zlot CH, Walzem RL, Pierotti V, Driscoll R, Dichek D, Herz J, Young SG. (1998). Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice. *J Clin Invest* 102, 1559-1568.
- Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, Mickle DA. (2003). Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 108, 736-740.
- Vernochet C, Damilano F, Mourier A, Bezy O, Mori MA, Smyth G, Rosenzweig A, Larsson NG, Kahn CR. (2014). Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications. *FASEB J* 28, 4408-4419.
- Vicent D, Ilany J, Kondo T, Naruse K, Fisher SJ, Kisanuki YY, Bursell S, Yanagisawa M, King GL, Kahn CR. (2003). The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *J Clin Invest* 111, 1373-1380.
- Vigneri R, Goldfine ID, Frittitta L. (2016). Insulin, insulin receptors, and cancer. *J Endocrinol Invest* 39, 1365-1376.

- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, Wrenn SP, Narula J. (2005). Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2054-2061.
- von der Thüsen JH, Borensztajn KS, Moimas S, van Heiningen S, Teeling P, van Berkel TJ, Biessen EA. (2011). IGF-1 has plaque-stabilizing effects in atherosclerosis by altering vascular smooth muscle cell phenotype. *Am J Pathol* 178, 924-934.
- Wajchenberg BL. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21, 697-738.
- Wang CC, Gurevich I, Draznin B. (2003). Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways. *Diabetes* 52, 2562-2569.
- Wang J, Razuvaev A, Folkersen L, Hedin E, Roy J, Brismar K, Hedin U. (2012). The expression of IGFs and IGF binding proteins in human carotid atherosclerosis, and the possible role of IGF binding protein-1 in the regulation of smooth muscle cell proliferation. *Atherosclerosis* 220, 102-109.
- Wang M, Kim SH, Monticone RE, Lakatta EG. (2015). Matrix metalloproteinases promote arterial remodeling in aging, hypertension, and atherosclerosis. *Hypertension* 65, 698-703.
- Wang N, Tabas I, Winchester R, Ravalli S, Rabbani LE, Tall A. (1996). Interleukin 8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma. *J Biol Chem* 271, 8837-8842.
- Watanabe Y. (1980). Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis* 36, 261-268.
- White MF. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E413-E422.
- Whitehead JP, Humphreys P, Krook A, Jackson R, Hayward A, Lewis H, Siddle K, O'Rahilly S. (1998). Molecular scanning of the insulin receptor substrate 1 gene in subjects with severe insulin resistance: detection and functional analysis of a naturally occurring mutation in a YMXM motif. *Diabetes* 47, 837-839.
- Whittaker J, Groth AV, Mynarcik DC, Pluzek L, Gadsbøll VL, Whittaker LJ. (2001). Alanine scanning mutagenesis of a type 1 insulin-like growth factor receptor ligand binding site. *J Biol Chem* 276, 43980-43986.
- Whittaker J, Sørensen H, Gadsbøll VL, Hinrichsen J. (2002). Comparison of the functional insulin binding epitopes of the A and B isoforms of the insulin receptor. *J Biol Chem* 277, 47380-47384.
- Whitworth NS, Meeks GR. (1985). Hormone metabolism: body weight and extraglandular estrogen production. *Clin Obstet Gynecol* 28, 580-587.
- Williams B, Baker AQ, Gallacher B, Lodwick D. (1995). Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 25, 913-917.
- Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, *et al.* (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 900-904.
- Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, *et al.* (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366-376.
- Wuttge DM, Zhou X, Sheikine Y, Wågsäter D, Stemme V, Hedin U, Stemme S, Hansson GK, Sirsjö A. (2004). CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 750-755.
- Xu W, Yu L, Zhou W, Luo M. (2006). Resistin increases lipid accumulation and CD36 expression in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 376-382.
- Yamagishi H, Kim S, Nishikimi T, Takeuchi K, Takeda T. (1993). Contribution of cardiac renin-angiotensin system to ventricular remodelling in myocardial-infarcted rats. *Mol Cell Cardiol* 25, 1369-1380.
- Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzmán M, Brownlee M. (2001). Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem* 276, 25096-25100.

- Yamaguchi Y, Flier JS, Benecke H, Ransil BJ, Moller DE. (1993). Ligand-binding properties of the two isoforms of the human insulin receptor. *Endocrinology* 132, 1132-1138.
- Yang M, Kahn AM. (2008). Insulin-inhibited and stimulated cultured vascular smooth muscle cell migration are related to divergent effects on protein phosphatase-2A and autonomous calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Atherosclerosis* 196, 227-233.
- Young P, Arch JR, Ashwell M. (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett* 167, 10-14.
- Yu C, Wang Z, Han Y, Liu Y, Wang WE, Chen C, Wang H, Jose PA, Zeng C. (2014). Dopamine D4 receptors inhibit proliferation and migration of vascular smooth muscle cells induced by insulin via down-regulation of insulin receptor expression. *Cardiovasc Diabetol* 13, 97.
- Yu YH, Ginsberg HN. (2005). Adipocyte signaling and lipid homeostasis: sequelae of insulin-resistant adipose tissue. *Circ Res* 96, 1042-1052.
- Zaina S, Pettersson L, Åhrén B, Brånén L, Hassan AB, Lindholm M, Mattsson R, Thyberg J, Nilsson J. (2002). Insulin-like growth factor II plays a central role in atherosclerosis in a mouse model. *J Biol Chem* 277, 4505-4511.
- Zernecke A, Weber C. (2010). Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 86, 192-201.
- Zhang SH, Reddick RL, Burkey B, Maeda N. (1994a). Diet-induced atherosclerosis in mice heterozygous and homozygous for apolipoprotein E gene disruption. *J Clin Invest* 94, 937-945.
- Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258, 468-471.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. (1994b). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SW. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci* 129, 83-94.

8. Anexos

Severe Brown Fat Lipoatrophy Aggravates Atherosclerotic Process in Male Mice

Gómez-Hernández, Almudena, PhD^{1,2,3,4}; Beneit Nuria, BSc^{1,2,3},
Escribano Óscar, PhD^{1,2,3}, Díaz-Castroverde, Sabela, BSc^{1,2,3},
García-Gómez Gema, BSc^{1,2,3}, Fernández, Silvia, BSc^{1,2,3}; Benito Manuel PhD^{1,2,3},

¹Biochemistry and Molecular Biology II Department, School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Spain. ²Health Research Institute of San Carlos Clinic Hospital (IdISSC), Madrid, Spain. ³CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases, Spain

Obesity is one of the major risk factors for the development of cardiovascular diseases and is characterized by abnormal accumulation of adipose tissue, including perivascular adipose tissue (PVAT). However, brown adipose tissue (BAT) activation reduces visceral adiposity. To demonstrate that severe brown fat lipoatrophy might accelerate atherosclerotic process, we generated a new mouse model without insulin receptor (IR) in BAT and without apolipoprotein E (BATIRKO; ApoE^{-/-} mice) and assessed vascular and metabolic alterations associated to obesity. In addition, we analyzed the contribution of the adipose organ to vascular inflammation.

Brown fat lipoatrophy induces visceral adiposity, mainly in gonadal depot (gWAT), severe glucose intolerance, high postprandial glucose levels and a severe defect in acute insulin secretion. BATIRKO; ApoE^{-/-} mice showed greater hypertriglyceridemia than the obtained in ApoE^{-/-} and hypercholesterolemia similar to ApoE^{-/-} mice. BATIRKO; ApoE^{-/-} mice, in addition to primary insulin resistance in BAT, also showed a significant decrease in insulin signaling in liver, gWAT, heart, aorta artery and tPVAT. More importantly, our results suggest that severe brown fat lipoatrophy aggravates the atherosclerotic process, characterized by a significant increase of: lipid depots, atherosclerotic coverage, lesion size and complexity, increased macrophage infiltration and proinflammatory markers expression. Finally, an increase of TNF- α and leptin as well as a decrease of adiponectin by BAT, gWAT and tPVAT might also be responsible of vascular damage.

Our results suggest that severe brown lipoatrophy aggravates atherosclerotic process. Thus, BAT activation might protect against obesity and its associated metabolic alterations.

One of the main causes of mortality in Western countries is cardiovascular disease (CVD). It is estimated that about 23.3 million people will die from CVD in 2030, mainly from heart disease and stroke (1). Most of them might be prevented by acting on CVD risk factors such as cigarette consumption, unhealthy diets and obesity, physical inactivity, high blood pressure (BP), diabetes or hyperlipidemias (1–4). The underlying cause of the great majority of cardiovascular disease is atherosclerosis. This process can affect at different vascular territories leading

to diverse clinical manifestations characterized by the formation of atherosclerotic plaques in the different arteries and thus the obstruction of blood flow, or ischemia (5–6).

Obesity is one of the major risk factors for the development of cardiovascular diseases and develops when energy intake exceeds energy expenditure (7). It is characterized by excessive or abnormal accumulation of adipose tissue, including depots which surround the blood vessels named perivascular adipose tissue (PVAT) (8). Traditionally, adipose tissue has been classified as white adipose

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in USA
Copyright © 2016 by the Endocrine Society
Received March 8, 2016. Accepted July 11, 2016.

Abbreviations: Akt: protein kinase B; ApoE^{-/-}: apolipoprotein E knockout; BAT: brown adipose tissue; BATIRKO: brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; gWAT: gonadal white adipose tissue; iNOS: inducible nitric oxide synthase; IR: insulin receptor; iWAT: inguinal white adipose tissue; qRT-PCR: real-time quantitative PCR; rtWAT: retroperitoneal white adipose tissue; tPVAT: thoracic perivascular adipose tissue; UCP-1: uncoupling protein 1; vWAT: visceral white adipose tissue

Table 1. Metabolic and lipid profile from BATIRKO; ApoE^{-/-} model. All BATIRKO mice showed severe brown fat lipoatrophy (decrease interscapular BAT/body weight). BATIRKO; ApoE^{-/-} mice presented high visceral adiposity due to an increase of WAT mass/body weight ratio (mainly gonadal fat depot) and % total fat measure by IMR (%Fat/Vt). Moreover, BATIRKO; ApoE^{-/-} mice in addition to hypercholesterolemia like ApoE^{-/-} mice, presented higher hypertriglyceridemia than ApoE^{-/-} mice. BATIRKO; ApoE^{-/-} also showed high postprandial glucose levels and hypoinsulinemia as BATIRKO WD mice. **P* < 0.05 vs. Control STD; †*P* < 0.05 vs. Control WD; §*P* < 0.05 vs. BATIRKO WD; #*P* < 0.05 vs. ApoE^{-/-} WD; gonadal WAT (gWAT); retroperitoneal WAT (rpWAT); inguinal WAT (iWAT); total WAT (tWAT = gWAT + rpWAT + iWAT); visceral WAT (vWAT = gWAT + rpWAT).

	C STD (n = 10)	C WD (n = 10)	B WD (n = 10)	ApoE ^{-/-} WD (n = 10)	BATIRKO;ApoE ^{-/-} - WD (n = 10)
Fasting Parameters					
Body weight (g)	28.4 ± 0.3	30.6 ± 0.6	30.08 ± 0.8	29.7 ± 0.5	29.4 ± 0.6
BAT(mg)/ BW (g)	3.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1	1.3 ± 0.2; *†#	3.3 ± 0.2	1.3 ± 0.1; *†#
tWAT (mg)/BW (g)	21.8 ± 0.5	52 ± 1;*	46 ± 2;*	52 ± 4;*	48 ± 6;*
vWAT (mg)/BW (g)	18.7 ± 1	32 ± 2;*	38 ± 2; *†#	26 ± 2	36 ± 3; *†#
gWAT (mg)/ BW (g)	10.4 ± 0.8	26 ± 1	30 ± 2; *†#	15 ± 2	28 ± 2; *†#
rpWAT (mg)/ BW (g)	5 ± 0.3	11 ± 0.5;*	9 ± 0.7;*	14 ± 0.2;*	11 ± 0.7;*
iWAT (mg)/ BW (g)	7.5 ± 0.6	12 ± 0.6;* §	8.5 ± 0.6	14 ± 4	11 ± 3
Liver (mg)/ BW (g)	37.2 ± 0.5	35 ± 0.9	43 ± 1	39 ± 2	39.1 ± 0.5
Insulin (ng/dL)	0.3 ± 0.03	0.4 ± 0.03	0.29 ± 0.02; †#	0.42 ± 0.03	0.2 ± 0.01; *†#
Fasting Glucose (mg/dL)	93.4 ± 3	93 ± 5	104.5 ± 1.3	90.5 ± 3.1	94.3 ± 3.6
Cholesterol (mg/dL)	128 ± 11	187 ± 13	178 ± 14	831 ± 71; *†§	842 ± 43; *†§
Triglycerides (mg/dL)	35 ± 3.8	31.7 ± 2.1	35.9 ± 3.6	181.2 ± 13; *†§	234 ± 13; *†§#
Feeding Parameters					
Body weight (g)	28 ± 1	29.3 ± 0.9	30.5 ± 0.6	29.2 ± 0.8	30.6 ± 0.3
BAT(mg)/ BW (g)	4.6 ± 0.1	5.1 ± 0.5	1.1 ± 0.1; *†#	4.4 ± 0.3	0.8 ± 0.02; *†#
tWAT (mg)/BW (g)	23 ± 0.5	37 ± 5; *#	43 ± 3; *#	26.2 ± 1;*	44 ± 2;*#
vWAT (mg)/BW (g)	20 ± 1	36 ± 1; *#	35.6 ± 2; *#	14.5 ± 1	32 ± 0.8;*#
gWAT (mg)/ BW (g)	11 ± 0.8	27.8 ± 1; *#	28 ± 3; *#	11 ± 0.5	22 ± 0.7; *#
rpWAT (mg)/ BW (g)	6 ± 0.3	8.4 ± 1.3	7.1 ± 0.7	3 ± 0.7	10 ± 0.4;*
iWAT (mg)/ BW (g)	8 ± 0.2	12.6 ± 3;*	7.9 ± 0.8	9.8 ± 0.2	9.8 ± 0.2
Liver (mg)/ BW (g)	40.3 ± 0.4	61.3 ± 1.8;*	56.4 ± 0.6; *	59.7 ± 0.7; *	59.7 ± 0.7; *
%Fat/Vt	35 ± 2.1	36 ± 2	31.4 ± 1	33 ± 1	43.5 ± 3.6; *§#
Feeding Glucose (mg/dL)	141 ± 7	145 ± 5	150 ± 2.5	150 ± 3	164 ± 1.3; *§

tissue (WAT) or brown adipose tissue (BAT). WAT is mainly involved in the storage and mobilization of energy and is the primary site of production of cytokines and hormones that modulate whole-body metabolism and insulin resistance (9, 10); whereas BAT specializes in dissipating energy as heat during cold or diet-induced non-shivering thermogenesis. BAT activation reduces adiposity and protects mice from diet-induced obesity (11). Uncoupling protein 1 (UCP-1) has been identified as mitochondrial responsible for the function of BAT (12). Studies of animals lacking BAT or UCP-1 have clearly demonstrated the ability of BAT thermogenesis to protect against diet-induced obesity (13). Recently, brown-like adipocytes were discovered in WAT and are called beige or brite adipocytes. Interestingly, these beige/brite cells resemble white fat cells in the basal state, but they respond to thermogenic stimuli with increased levels of thermogenic genes and increased respiratory rates (14).

In pathological conditions especially obesity-related cardiovascular diseases, the beneficial effects of PVAT on

vascular functions are impaired (PVAT dysfunction) and transformed into detrimental roles (8). Like other adipose tissue depots, PVAT also secretes numerous biologically active substances that can act in both autocrine and paracrine fashion. PVAT has also proven to be involved in vascular inflammation (15–17). In addition, individuals with low BAT levels are prone to excessive accumulation of white adipose tissue and weight gain (11, 13) and its levels are inversely correlated with body mass index (BMI) (18). In this context, BATIRKO mouse is a unique model of brown fat lipoatrophy and diabetes owing to an insulin secretion defect and with vascular insulin resistance and dysfunction (19). Thus, we hypothesized that severe brown fat lipoatrophy associated to visceral adiposity and vascular alterations in the endothelium, might aggravates atherosclerotic process. To address this issue, we have generated a new mouse model bearing no IR in BAT and lacking apolipoprotein E (BATIRKO; ApoE^{-/-}) and assess vascular and metabolic alterations associated to adiposity. In addition, we also analyzed the contribution of several

Table 2. Antibody Table

Peptide/protein target	Antigen sequence (if known)	Name of Antibody	Manufacturer, catalog #, and/or name of individual providing the antibody	Species raised in; monoclonal or polyclonal	Dilution used
IR β subunit	C-terminus of insulin R β of human origin	insulin R β (C-19) Antibody	Santa Cruz Biotechnology, sc-711	rabbit; polyclonal	1/1000
phospho-AKT (Ser473)	endogenous levels of Akt1 only when phosphorylated at Ser473	Phospho-Akt (Ser473) Antibody	Cell Signalling Technology, #9273	rabbit; polyclonal	1/1000
AKT	endogenous levels of total Akt1, Akt2 and Akt3 proteins	AKT Antibody	Cell Signalling Technology, #9272	rabbit; polyclonal	1/1000
β -actin	N-terminal end of the β -isoform of actin	Anti- β -actin	Sigma-Aldrich, A5316	mouse; monoclonal	1/1000
NOS-2	a peptide mapping near the N-terminus of NOS2 of human origin	NOS2 (N-20)	Santa Cruz Biotechnology, sc-651	rabbit; polyclonal	1/1000
F4/80		anti-F4/80	AbD Serotec, MCA497GA	rat; monoclonal	1/100
UCP-1	C-terminus of UCP1 of mouse origin	UCP1 Antibody (M-17)	Santa Cruz Biotechnology, sc-6529	goat; polyclonal	1/500
HSL	total HSL protein	HSL Antibody	Cell Signalling Technology, #4107	rabbit; polyclonal	1/1000
CPT1-M	amino acids 16–135 mapping near the N-terminus of CPT1-M of human origin	CPT1-M Antibody (H-120)	Santa Cruz Biotechnology, sc-20 670	rabbit; polyclonal	1/1000
phospho-AMPK (Thr172)	endogenous AMPK α only when phosphorylated at threonine 172	Phospho-AMPK α (Thr172) Antibody	Cell Signalling Technology, #25315	rabbit; polyclonal	1/1000
AMPK	endogenous levels of AMPK α protein	AMPK α Antibody	Cell Signalling Technology, #2532	rabbit; polyclonal	1/1000
Hsp60		HSP60 (mouse), (recombinant)	Enzo Life Sciences, ADI-SPP-741	mouse; monoclonal	1/1000
VDAC1/ Porin	residues 150–250 of Human VDAC1/ Porin	Anti-VDAC1/ Porin Antibody	Abcam, ab15895	rabbit; polyclonal	1/1000
ATP5H		Anti-ATP5H Antibody [7F9B8G1]	Abcam, ab110275	mouse; monoclonal	1/500
phospho-Tyr		4G10 Platinum, Anti-Phosphotyrosine Antibody	Millipore, #05–1050	mouse; monoclonal	1/1000
IRS1	Carboxy-terminal 14 amino acid peptide ((C)YASINFQKPEDRQ) of rat liver IRS1	Anti-IRS1	Millipore, #06–248	rabbit; polyclonal	1/500
IRS2	GST fusion protein containing amino acids 976–1094 of mouse IRS2	Anti-IRS2	Millipore, #06–506	rabbit; polyclonal	1/500
PI3K p85 α subunit	amino acids 333–430 of the 85 kDa subunit of PI 3-kinase of human origin	PI3 Kinase p85 α	Santa Cruz Biotechnology, sc-423	rabbit; polyclonal	1/1000

components of the adipose organ (PVAT, BAT and vis-

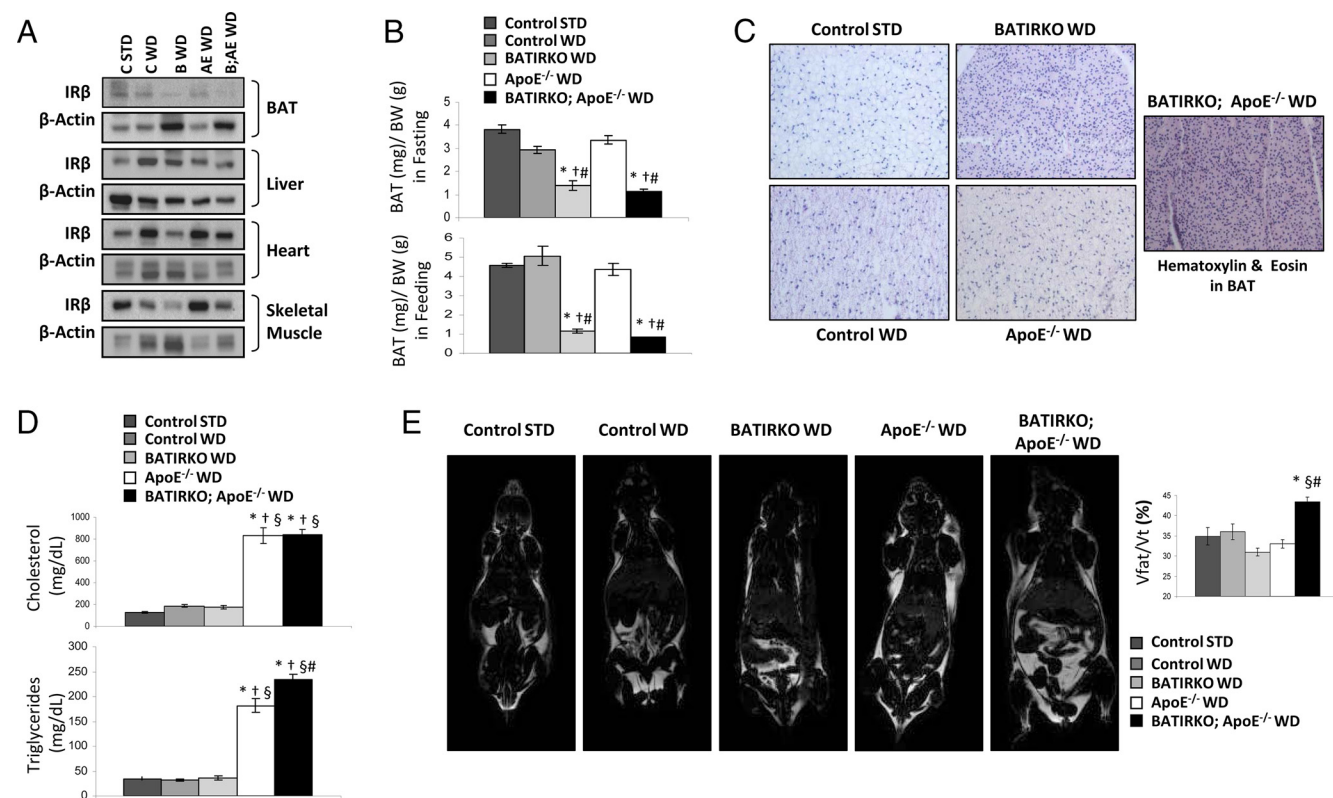


Figure 1. Characterization of BATIRKO;ApoE^{-/-} model. A, Western blot analysis of IR in BAT, liver, heart and skeletal muscle from five groups. B, BAT (mg)/ Body weight (g) ratio in animals fasted and fed from the five groups studied. C, Hematoxylin and eosin in BAT included in paraffin to check brown lipodystrophy associated to BATIRKO mice. D, Cholesterol and triglycerides plasma levels from the five groups. E, Representative magnetic nuclear resonance images to assess % fat volume vs. total volume. AE: ApoE^{-/-}; B: BATIRKO; C: Control; STD: standard diet; WD: Western type diet. **P* < .05 vs. Control STD; †*P* < .05 vs. Control WD; §*P* < .05 vs. BATIRKO WD; #*P* < .05 vs. ApoE^{-/-} WD. CSTD (n = 10); CWD (n = 10); BWD (n = 10); AEWD (n = 10); B/AEWD (n = 10).

ceral WAT) to the expression of vascular inflammatory markers.

Materials and Methods

Experimental Models

IRloxP/loxP mice under C57BL/6 genetic background were created by homologous recombination using an IR gene-targeting vector with loxP sites flanking exon 4 as described (19, 20). The control group is formed by IRloxP/loxP C57BL/6 mice and wild type C57BL/6 mice. Transgenic mice expressing a Cre recombinase transgene under UCP-1 promotor have been described previously (19). BATIRKO mice were obtained on the background of IRloxP/loxP mice for 14 generations to assure a unique genetic background. Male mice fed a standard diet (STD, 3% calories from fat) or Western type diet (WD, 21% calories from fat) for 18 weeks. The animals were sacrificed at 24 weeks of age. The five groups used have been the following: Control STD (n = 10), Control WD (n = 10), BATIRKO WD (n = 10), ApoE^{-/-} WD (n = 10) and BATIRKO; ApoE^{-/-} WD (n = 10).

Genotyping of the IRloxP/loxP, UCP-1-Cre transgenic and ApoE^{-/-} mice were performed by PCR as described (19). Animal housing conditions included a 12-hour light, 12-hour dark cycle and 23°C room temperature. All animal experimentation described in this manuscript was conducted according with accepted standards of human animal care, as approved by the cor-

responding institutional committee of Complutense University of Madrid. All animal procedures have been performed conform the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes or the NIH guidelines.

In vivo insulin signaling studies

For in vivo insulin signaling studies, mice in fed state were injected with 1 U/kg body weight of human insulin (Novo Nordisk, Madrid, Spain) into the peritoneal cavity. After 10 minutes, mice were euthanized with 250 mg/kg Avertin, tissues were removed and immediately frozen in liquid nitrogen. We studied by Western blot phospho-AKT (Ser473) in BAT, visceral WAT (gonadal and retroperitoneal depots), subcutaneous WAT (inguinal depot), liver, heart, thoracic PVAT (tPVAT) and aorta artery. Additionally, we analyzed phospho-Tyr in IR, IRS-1, or IRS-2 in the liver and in IRS-1 in gWAT from ApoE^{-/-} WD vs. BATIRKO; ApoE^{-/-} WD mice, as well as the associations between IR and IRSs in the liver, and IRS and PI3Kp85 α subunit in the liver and gWAT.

Analytical procedures

Plasma levels of insulin were analyzed using ELISA kits (Millipore). Cholesterol and triglycerides were tested in plasma samples from fasted mice (Spinreact, Barcelona, Spain). Blood glucose level was determined in fasted animals using an automatic monitor (Roche Molecular Biochemicals GmbH, Mannheim,

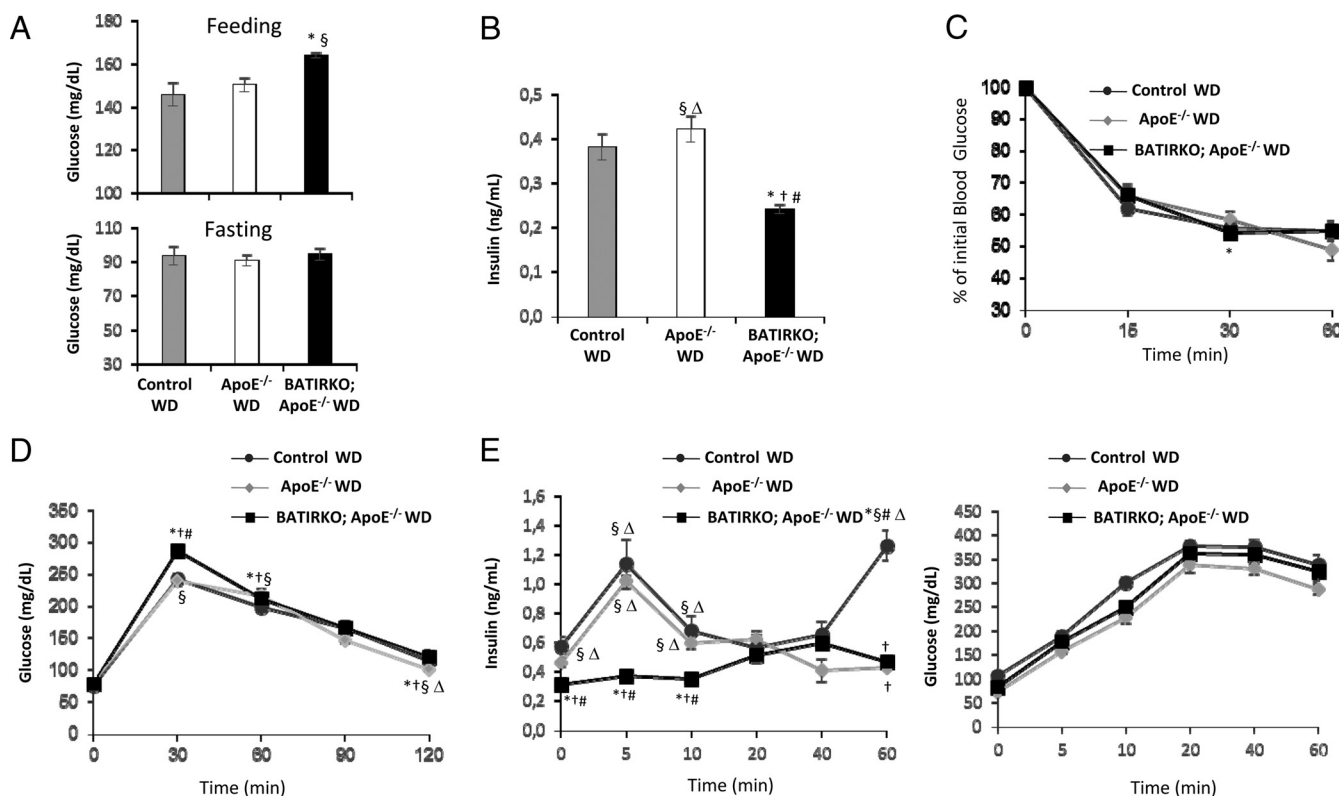


Figure 2. Analysis of glucose metabolism alterations in BATIRKO;ApoE^{-/-} model. A, Glucose plasma levels of fasted or fed mice by automatic monitor. B, Insulin plasma levels in fasted mice by ELISA. Insulin tolerance test (C), glucose tolerance test (D) and insulin secretion test (E) performed in Control WD, ApoE^{-/-} WD and BATIRKO; ApoE^{-/-} WD. WD: Western type diet. **P* < .05 vs. Control STD; †*P* < .05 vs. Control WD; §*P* < .05 vs. BATIRKO WD; #*P* < .05 vs. ApoE^{-/-} WD; Δ*P* < .05 vs. BATIRKO;ApoE^{-/-} WD. CSTD (n = 10); CWD (n = 10); BWD (n = 10); AEWD (n = 10); B;AEWD (n = 10).

Germany). Acute insulin release experiments and glucose and insulin tolerance tests were performed as described (19).

Histological analysis

Paraffin-embedded BAT was cross-sectioned into 4- μ m-thick pieces at 5-mm intervals, dewaxed, and rehydrated. Paraffin-embedded BAT was stained with Hematoxylin & Eosin to measure the brown adipocyte size (Image J).

Aortic roots and livers were optimal cutting temperature embedded, and sections of 7 μ m were Oil Red O/hematoxylin stained to measure lipid depot. Macrophages and iNOS were detected by immunoperoxidase with rat antimouse F4/80 antigen (MCA497GA; AbD Serotec, Raleigh, NC) and rabbit iNOS polyclonal antibody (06-284; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), respectively. After that incubation with each primary antibody overnight, we incubated with a peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 hour at 1:200 dilutions. The sections were stained for 10 minutes at room temperature with

3,3-diaminobenzidine and then counterstained with hematoxylin and mounted in Ibbidi mounting medium (Ibbidi GmbH, Munich, Germany). In each experiment, negative controls without the primary antibody or using a nonrelated antibody were included to check for nonspecific staining.

Magnetic Nuclear Resonance Imaging

24-week-old Control STD, Control WD, BATIRKO WD, ApoE^{-/-} WD and BATIRKO;ApoE^{-/-} WD male mice were anesthetized with ECG and respiration continuously monitored and fat was measured by MNRI. The coil was positioned over epididymal fat in the abdomen. MNRI measurements were performed using a Bruker BIOSPEC 47/40 spectrometer (Bruker GmbH, Ettlingen, Germany) operating at 4.7 Tesla (200 MHz) superconducting magnet (Oxford Instruments Ltd., Oxford, UK) and high-performance actively shielded gradients with a maximum gradient strength of 50 mT/m. Data were collected as 256 \times 128 matrices using the standard Bruker RARE_MOD

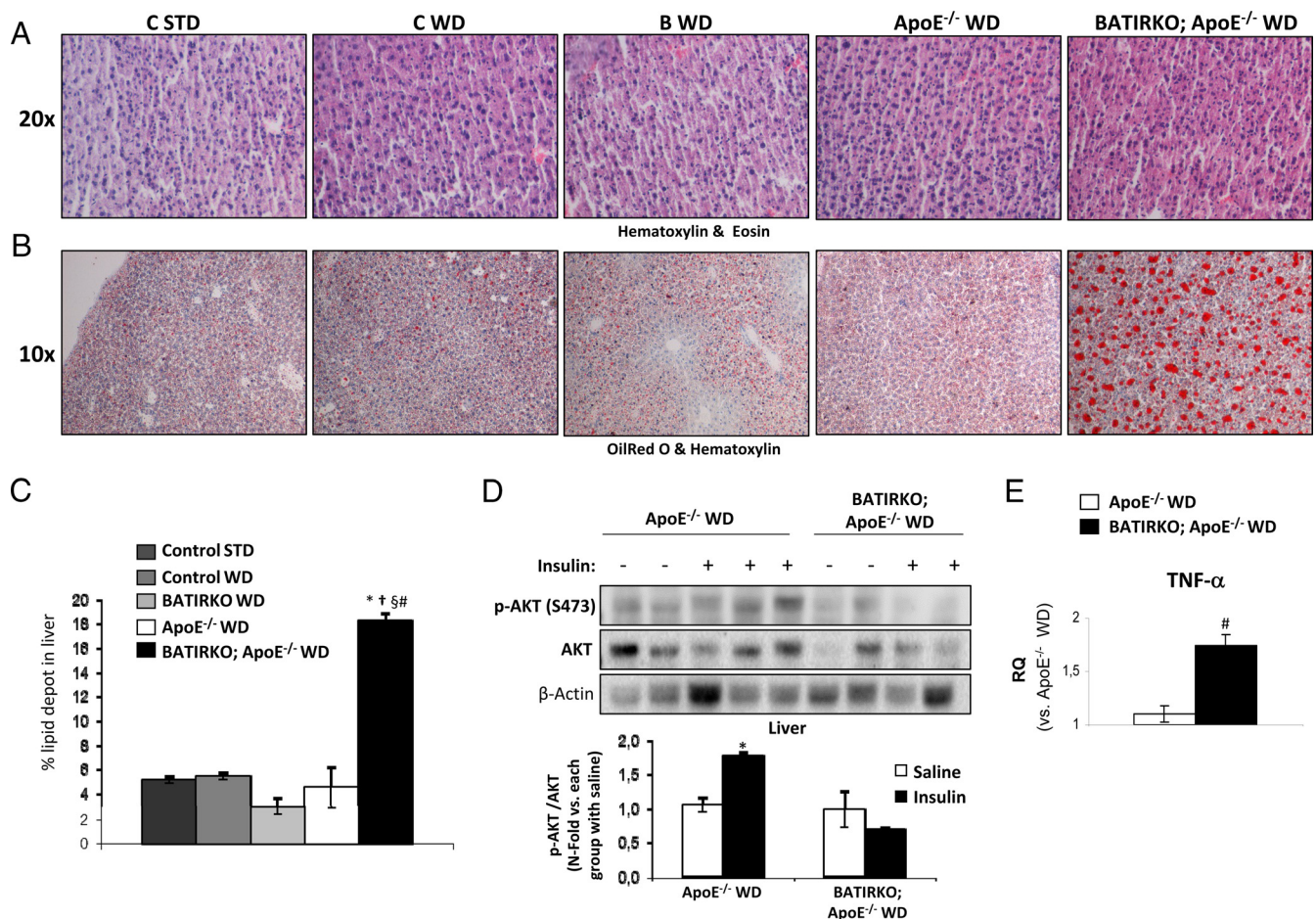


Figure 3. Characterization of liver from BATIRKO;ApoE^{-/-} model. A, Representative microphotographs of liver stained with hematoxylin and eosin in Control WD, ApoE^{-/-} WD and BATIRKO;ApoE^{-/-} WD. 200X of magnification. Representative microphotographs (B) and quantification (C) of livers stained with Oilred O contrasted with hematoxylin to identify lipid depots. 100X of magnification. AE: ApoE^{-/-}; B: BATIRKO; C: Control; STD: standard diet; WD: Western type diet. **P* < .05 vs. Control STD; †*P* < .05 vs. Control WD; §*P* < .05 vs. BATIRKO WD; #*P* < .05 vs. ApoE^{-/-} WD. CSTD (n = 10); CWD (n = 10); BWD (n = 10); AEWD (n = 10); B;AEWD (n = 10). D, In vivo insulin signaling studies in liver from ApoE^{-/-} vs. BATIRKO;ApoE^{-/-} mice. Western blot analysis of Akt phosphorylation. **P* < .05 vs. each group with saline. CSTD (n = 5); CWD (n = 5); BWD (n = 5); AEWD (n = 5); B;AEWD (n = 5). E, qRT-PCR analysis of *Tnfα* mRNA expression in liver from ApoE^{-/-} WD and BATIRKO;ApoE^{-/-} WD. Thus, the amount of target, normalized to endogenous gene and relative to the control is given by real-time quantitative PCR [(RQ) = 2^{-ΔΔCt}; ΔCt (cycle threshold) = Ct (target gene) - Ct (GAPDH); ΔΔCt = ΔCt for any sample - ΔCt for the control]. Amplification of GAPDH was used in the same reaction of all samples as an internal control. We have used ΔΔCt referred to ApoE^{-/-} WD. #*P* < .05 vs. ApoE^{-/-} WD.

(Fast spin-echo) sequence, which yields T2-weighted images. The results were represented as fat body volume vs total body volume using Image J Launcher 1.46 software.

Western blot analysis

Western blot analysis was performed on tissue homogenates as described (20). The antibodies used were anti-IR β (Ab-4), UCP-1, CPTI-M and PI3Kp85 α subunit from Santa Cruz Biotechnology; phospho-AKT (Ser473), AKT, HSL, p-AMPK (Thr173) and AMPK from Cell Signaling Technology (Danvers, MA); IRS-1, IRS-2 and phosphor-Tyr from Millipore; VDAC1/ Porin and ATP5H from AbCam; Hsp60 from EnzoLife Science and anti- β -actin and α -tubulin antibodies from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO). Fifty micrograms of whole proteins were separated on an 8%–15% SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Immobilon P; Millipore). The membrane was blocked in washing solution with 5% nonfat dried milk for 60 minutes at 37°C and then incubated with 1 μ g/ml primary antibody overnight at 4°C and later with a peroxidase-conjugated secondary antibody for 60 minutes at 37°C. All antibodies were prepared in 1X TBS, 0.1% Tween (Table 1). Immunoreactive bands were visualized using the ClarityTM 22 ECL Western blotting protocol (Biorad, Hercules, California, USA).

Immunoprecipitation

The protein extracts from liver or gWAT were resuspended in lysis buffer and collected the supernants after centrifugation at 12 000 rpm for 10 minutes at 4°C. After protein content determination, 500 μ g of protein were immunoprecipitated at 4°C with the corresponding antibodies (IR, IRS-1, IR-2 or phosphor-Tyr). The immune complexes were collected on protein A-agarose beads or G-agarose beads submitted to SDS-PAGE and incubated against phospho-Tyr, IRS-1, IRS-2, IR or PI3Kp85 α subunit.

RNA Extraction and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from several tissues by TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, CA) and quantified by absorbance at 260 nm in duplicate. The gene expression was analyzed by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) as described (20). Thus, the amount of target, normalized to endogenous gene and relative to the control is given by real-time quantitative (RQ) = $2^{-\Delta\Delta C_t}$; ΔC_t (cycle threshold) = C_t (target gene) - C_t (GAPDH); $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ for any sample - ΔC_t for the control]. Amplification of GAPDH was used in the same reaction of all samples as an internal control.

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed using a one-way ANOVA, followed by a Bonferroni test if differences were noted (Graph Pad Prism 5.0, La Jolla, CA, USA). The null hypothesis was rejected when the P value was < 0.05.

Results

Severe brown fat lipotrophy induces adiposity, lipid and glucose metabolic alterations

Brown fat-specificity of IR deletion was assessed by IR Western-blot in several tissues in the five group of animals

studied (Figure 1A). BATIRKO and BATIRKO; ApoE^{-/-} mice showed a significant decrease of interscapular brown adipose tissue mass (Figure 1B and Table 1) and a marked eosinophilia (Figure 1C) and also a significant reduction in the brown adipocyte size and fewer and smaller fat droplets observed in the BAT as compared with their controls (Supplemental Figure 1). Moreover, there was a significant increase in the gene expression of brown fat thermogenic markers such as *Ucp1*, *Prdm16*, *Fgf21* and *Pgc1 α* at mRNA level, as a compensatory mechanism to the severe brown fat lipotrophy observed in BATIRKO or in BATIRKO; ApoE^{-/-} mice (Supplemental Figure 2A). Also we explored the mitochondrial content as visualized by the expression of mitochondrial markers such as Hsp60 and Porin. The level of the expression of those proteins was very similar along the five groups of mice studied (Supplemental Figure 2B).

Regarding western diet used as a high fat diet, the expression of metabolic proteins such as HSL, CPTI-M, p-AMPK and ATP synthase were increased in all groups of mice studied vs Control under standard diet, providing fatty acylCoA accessible to the mitochondria and favoring β -oxidation and respiratory chain and the uncoupling of ATP synthesis (Supplemental Figure 2B).

In addition, BATIRKO and BATIRKO; ApoE^{-/-} brown fat lipotrophic mice increased visceral adiposity (vWAT), mainly in the gonadal depots (gWAT) (Table 1). More importantly, magnetic nuclear resonance imaging revealed that only BATIRKO; ApoE^{-/-} mice presented a significant increase of % fat volume / total volume as compared to Control STD, BATIRKO WD or ApoE^{-/-} WD, respectively (Figure 1E and Table 1).

Next, we analyzed the lipid profile. A significant increase of cholesterol and triglycerides plasma levels was noted in ApoE^{-/-} WD and in BATIRKO; ApoE^{-/-} WD in relation to Control STD, Control WD or BATIRKO WD mice (Figure 1D and Table 1). More importantly, we observed that triglycerides levels of BATIRKO; ApoE^{-/-} WD were significantly higher than obtained levels in ApoE^{-/-} WD mice (Figure 1D and Table 1).

Brown fat lipotrophy was also associated to alterations in glucose metabolism. Thus, BATIRKO; ApoE^{-/-} mice showed an elevated and significant postprandial hyperglycemia (Figure 2A and Table 1) with a marked hypoinsulinemia (Figure 2B and Table 1), a severe glucose intolerance (Figure 2D) with certain degree of insulin resistance accompanied a significant defect in acute insulin secretion (Figure 2C and E, respectively).

BATIRKO; ApoE^{-/-} mice presented a marked liver steatosis as compared with ApoE^{-/-} mice (Figure 3A, B and C). Moreover, we also observed a severe insulin resistance in the liver as visualized upon insulin treatment in vivo. Thus,

a significant impairment in Akt phosphorylation (Figure 3D), in the phosphorylation in Tyr of IRS-1 and IRS-2, and IRS-1 or IRS-2 associated PI3Kp85 α subunit (Supplemental Figure 3A, B and C) was observed in the BATIRKO; ApoE^{-/-} vs ApoE^{-/-} mice. These results correlated with the elevation of hepatic TNF- α observed in BATIRKO; ApoE^{-/-} vs ApoE^{-/-} mice (Figure 3E).

Severe brown fat lipotrophy aggravates atherosclerotic process

To assess whether the brown lipotrophy, besides its associated vascular alterations in the endothelium as we have previously described (19), could also aggravate the atherogenic process, we studied the vascular damage in BATIRKO; ApoE^{-/-} vs ApoE^{-/-} mice in a comparative manner (Figures 4 and 5). Thus, BATIRKO; ApoE^{-/-} mice presented a very significant increase of: vascular damage, lipid depots, stenosis and lesion area in the aortic roots as compared to ApoE^{-/-} mice (Figure 4A). By immunohistochemistry, we also observed that BATIRKO; ApoE^{-/-} had higher macrophage infiltration and expression of iNOS than the ApoE^{-/-} group (Figures 4B and 5C).

Moreover, by qRT-PCR we observed that BATIRKO; ApoE^{-/-} mice showed a significant increase of gene expres-

sion involved in atherogenic process, such as: ET-1, ICAM-1, MCP-1, TNF- α , PAI-1, IGF-1R as compared to Control WD (Figure 5A) and more importantly, in relation to ApoE^{-/-} mice (Figure 5B). However, eNOS mRNA expression was notably reduced in aorta artery from BATIRKO; ApoE^{-/-} vs. Control WD and ApoE^{-/-} mice (Figures 5A and 5B, respectively).

Severe brown fat lipotrophy induces peripheral insulin resistance

The lack of insulin receptor in the BAT-specific manner induces a primary insulin resistance in BAT from BATIRKO; ApoE^{-/-} mice as described in Figure 6A, as revealed by the lack of response of Akt phosphorylation in response to insulin in vivo. In addition, a secondary insulin resistance was observed in BATIRKO; ApoE^{-/-} vs ApoE^{-/-}, Control WD and BATIRKO WD mice as revealed by the lack of Akt phosphorylation in aorta artery, heart, gWAT and tPVAT in response to insulin, insulin sensitivity in iWAT or rtWAT remained unchanged (Figure 6 and Supplemental Figure 4). In addition, a significant decrease of phosphorylation in Tyr of IRS-1 and a less association between IRS-1 and PI3Kp85 α subunit was observed in gWAT from

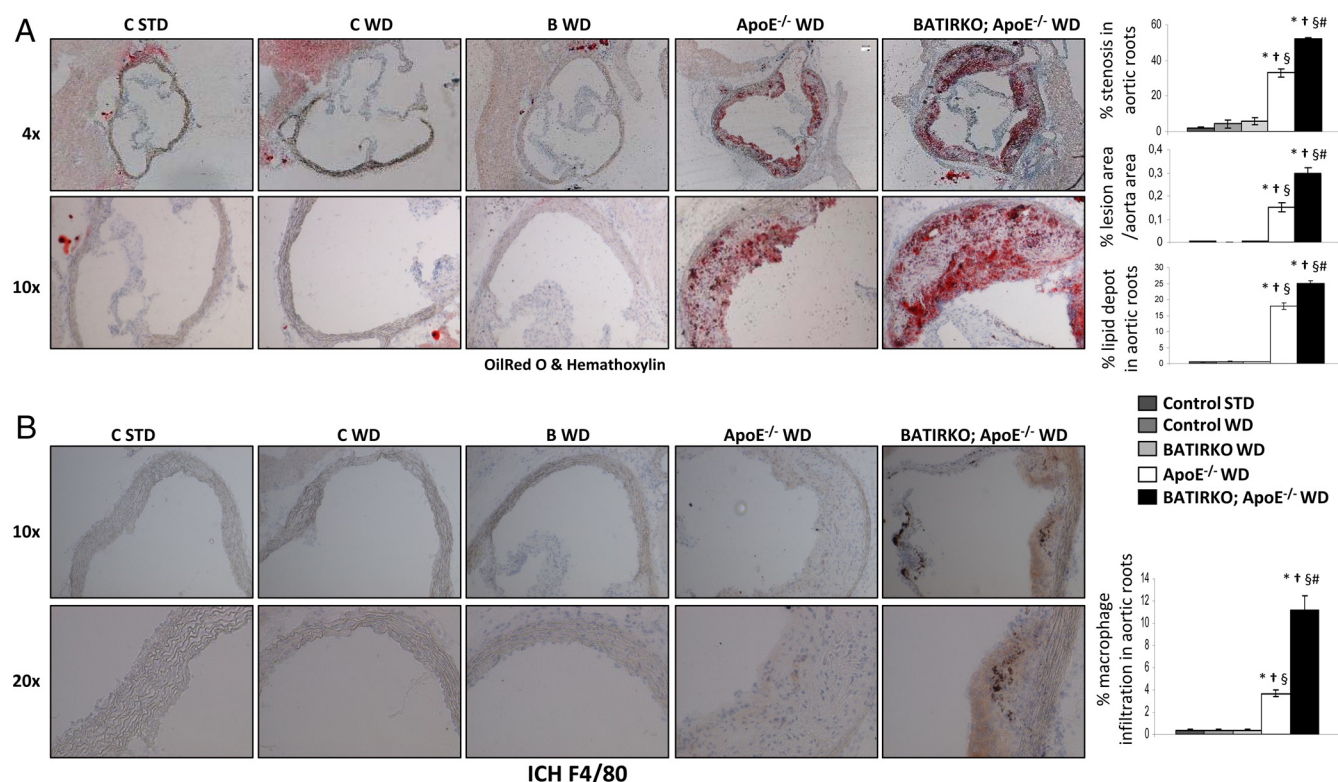


Figure 4. Analysis of vascular damage from BATIRKO;ApoE^{-/-} model. A, (Left) Representative microphotographs of aortic roots stained with Oilred O contrasted with hematoxylin. 40X and 100X of magnification. (Right) Graphics of quantifications of stenosis, lesion area and lipid depots in aortic roots from the five groups studied. B, Representative microphotographs (left) and quantification (right) of F4/80 immunohistochemistry in aortic roots from five groups to detect macrophage infiltration. 100X and 200X of magnification. AE: ApoE^{-/-}; B: BATIRKO; C: Control; STD: standard diet; WD: Western type diet. **P* < .05 vs. Control STD; †*P* < .05 vs. Control WD; §*P* < .05 vs. BATIRKO WD; #*P* < .05 vs. ApoE^{-/-} WD. CSTD (n = 10); CWD (n = 10); BWD (n = 10); AEWD (n = 10); B/AEWD (n = 10).

BATIRKO; ApoE^{-/-} mice vs. ApoE^{-/-} mice (Supplemental Figure 3D).

Contribution of BAT, visceral WAT and thoracic PVAT to the inflammation observed in BATIRKO; ApoE^{-/-} mice

Severe brown lipatrophy and increased visceral adiposity might much affect to the expression of the proinflammatory adipocytokines responsible for metabolic and vascular alterations associated with visceral adiposity. To address this issue, we analyzed by qRT-PCR, the expression of TNF- α , leptin, adiponectin in BAT and several components of the adipose organ. A significant increase in TNF- α mRNA expression in BAT, gWAT and tPVAT was observed in BATIRKO; ApoE^{-/-} mice as compared with ApoE^{-/-} mice (Figure 7A). Furthermore, leptin mRNA levels were significantly increased in gWAT and tPVAT from BATIRKO; ApoE^{-/-} vs. ApoE^{-/-} (Figure 7B). Finally, adiponectin mRNA levels were significantly decreased in the visceral WAT compartment (gWAT and rtWAT) and in tPVAT from BATIRKO; ApoE^{-/-} mice as compared to ApoE^{-/-} mice (Figure 7C).

Discussion

Both models, BATIRKO and BATIRKO; ApoE^{-/-} mice, owing to the specific deletion of insulin receptor upon development show a severe brown fat lipatrophy. This fact by itself confers susceptibility to obesity in mice (19, 21). In this regard, BATIRKO as BATIRKO; ApoE^{-/-} mice showed an increased visceral adiposity, mainly accounted by the gonadal compartment. More importantly total body fat volume as estimated by NMR was increased in BATIRKO; ApoE^{-/-} vs ApoE^{-/-} mice. Recently, it has been reported that the amount of brown adipose tissue is inversely correlated with BMI (18). Given the real contribution of BAT activity in protection against obesity and its metabolic complications in both, experimental models and humans, new therapeutic strategies are being studied and developed to fight against obesity (22). Thus, BAT is mainly regulated by the sympathetic nervous system (SNS); yet, recent findings have shown a group of novel activators that act independently of the stimulation of the SNS such as cardiac natriuretic peptides, irisin, interleukin-6, β -aminoisobutyric acid and fibroblast growth fac-

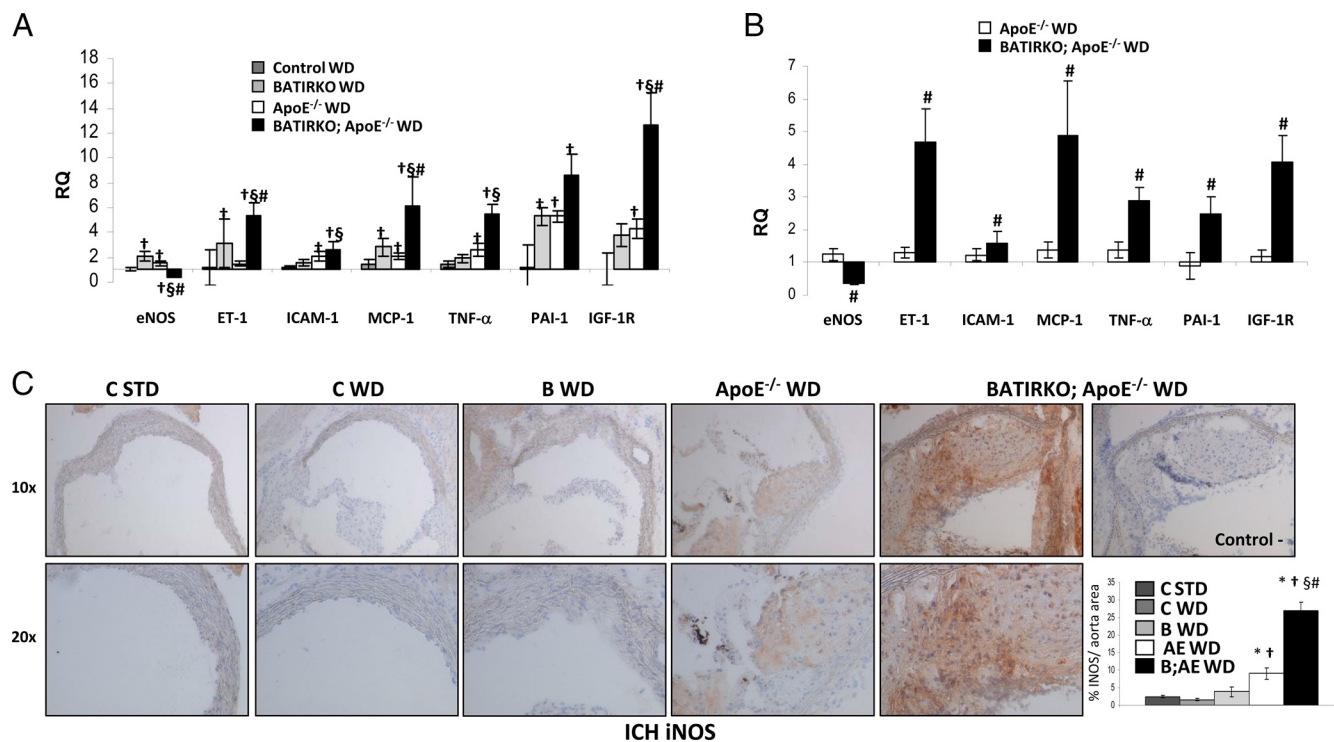


Figure 5. Analysis of vascular damage from BATIRKO; ApoE^{-/-} model. qRT-PCR analysis of *enos*, *et1*, *icam1*, *mcp1*, *tnfa*, *pai1* and *igf1r* mRNA expression in aorta artery from different groups. Thus, the amount of target, normalized to endogenous gene and relative to the control is given by real-time quantitative PCR [(RQ) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$; ΔCt (cycle threshold) = Ct (target gene) - Ct (GAPDH); $\Delta\Delta Ct$ = ΔCt for any sample - ΔCt for the control]. Amplification of GAPDH was used in the same reaction of all samples as an internal control. We have used $\Delta\Delta Ct$ referred to Control WD (A) and to ApoE^{-/-} WD (B). C, Representative microphotographs (left) and quantification (right) of iNOS immunohistochemistry in aortic roots from five groups. 100X and 200X of magnification. Negative control of iNOS immunohistochemistry was performed in same slide of aortic roots from BATIRKO; ApoE^{-/-} without primary antibody. AE: ApoE^{-/-}; B: BATIRKO; C: Control; STD: standard diet; WD: Western type diet. * P < .05 vs. Control STD; † P < .05 vs. Control WD; § P < .05 vs. BATIRKO WD; # P < .05 vs. ApoE^{-/-} WD. CSTD (n = 10); CWD (n = 10); BWD (n = 10); AEWD (n = 10); B;AEWD (n = 10).

tor 21 that could influence BAT metabolism (23). Moreover, exercise might activate and recruit human BAT through the activation of SNS, heart and skeletal muscle (23). Alternatively, cold exposure or brown adipocyte stem cell transplantation arose as two potential strategies for inducing activation and growth of BAT for the treatment of human obesity (24). In addition, over the last years it has been described that browning of progenitors or brite adipocytes present in skeletal muscle or in white fat to create a better white, BAT-like phenotype, with UCP-1 mRNA and high mitochondrial density and greater respiratory capacity (25–28). These new therapeutic strategies above described intended to achieve greater activation of BAT. Thus, severe brown lipoatrophy as occurred in BAT-IRKO; ApoE^{-/-} mice enhanced the hypertriglyceridemia observed in ApoE^{-/-} mice. Unlike, BAT activation increases plasma lipoprotein metabolism and accelerates clearance of their remnants by hepatic tissue reducing hypercholesterolemia and protecting from atherosclerosis development (29–32).

Beside lipid profile alterations, we have also observed alterations in glucose metabolism in BATIRKO; ApoE^{-/-} vs ApoE^{-/-} mice. In the last years, one of the functions that have been attributed to BAT is the regulation of glucose homeostasis (33–36). In this regard, it has been described

that activation of BAT in human beings could also have beneficial metabolic effects that might address obesity complications, such as type 2 diabetes, by ameliorating the glucolipotoxic pathological changes that underlie the development of peripheral insulin resistance and impaired insulin secretion due to pancreatic β -cell failure (33). BAT-IRKO; ApoE^{-/-} mice, in addition to primary insulin resistance in BAT, also showed a significant decrease in insulin signaling in liver, regarding the observed fatty liver, visceral WAT, regarding visceral adiposity, and also in heart, aorta artery and tPVAT.

Regarding vascular damage, our results suggest that severe brown fat lipoatrophy aggravates the atherosclerotic process, as characterized by a significant increase of: lipid depots, atherosclerotic coverage, lesion size and complexity, macrophage infiltration in addition to an increased expression of markers of vascular dysfunction and inflammation. Conversely, brown fat activation protects from atherosclerosis development as previously described (31). Moreover, it has also been suggested that adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications (37). Noteworthy, BAT-IRKO; ApoE^{-/-} mice showed vascular insulin resistance

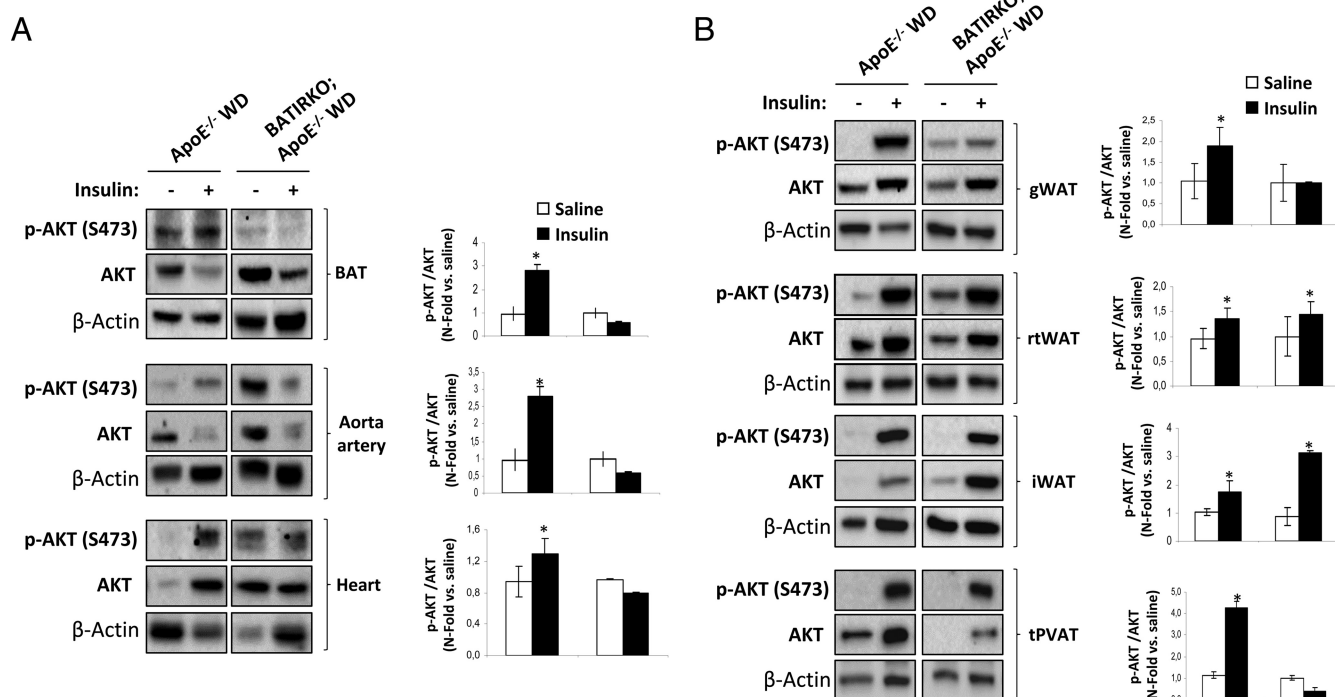


Figure 6. In vivo insulin signaling studies of BATIRKO; ApoE^{-/-} model. Western blot analysis of Akt phosphorylation in response to insulin in ApoE^{-/-} and BATIRKO; ApoE^{-/-} mice. Representative gels (A) and quantification of in vivo insulin signaling studies (B) performed in ApoE^{-/-} and BATIRKO; ApoE^{-/-} under WD for 18 weeks. After 10 minutes of human insulin injection at 1 U/kg body weight, BAT, aorta artery, heart, gWAT, rtWAT, iWAT and tPVAT were removed and immediately frozen in liquid nitrogen. Protein extracts were analyzed by Western blot with anti-phospho-AKT (Ser473), Akt and β -actin antibodies. A representative experiment of three is shown. * $P < .05$ vs. each group with saline. CSTD (n = 5); CWD (n = 5); BWD (n = 5); AEWD (n = 5); B;AEWD (n = 5).

likely owing to the local expression of proinflammatory molecules as discussed below.

We previously described that brown fat lipotrophy and increased visceral adiposity through a concerted adipocytokines overexpression induces vascular insulin resistance and dysfunction (19). To address this important issue, we studied the expression of proinflammatory adipocytokines in the adipose organ as well as in the thoracic perivascular adipose tissue that might be responsible for a local inflammatory effect that may account for the vascular insulin resistance above discussed. In this regard, we observed a high increase of TNF- α levels by BAT and tPVAT, together to an increase of leptin secreted by gWAT and tPVAT as well as a significant decrease of adiponectin of visceral WAT depots in BATIRKO; ApoE^{-/-} as compared with ApoE^{-/-} mice. Noteworthy, changes in adipose tissue are associated with systemic arterial dysfunction and insulin resistance, suggesting that adipose inflammation may be linked to vascular injury and increased cardiovascular risk in obese subjects (38). Moreover, in our work, we have studied the contribution of different fat depots: BAT,

WAT and tPVAT. We analyzed the production of adipocytokines by visceral WAT depots: gWAT and rtWAT and subcutaneous WAT depot: iWAT. BATIRKO; ApoE^{-/-} mice showed high visceral adiposity, insulin resistance and a higher proinflammatory profile in gWAT than in iWAT. On this regard, it was previously described that pathological alterations, such as growth of the individual fat cell, hypercellularity and increase of inflammatory cells have been found in the gonadal fat pad of five strains of spontaneously obese or diabetic mice (39). Regarding the thoracic perivascular adipose tissue (tPVAT), we focused on its contribution to the atherosclerotic process. It has been described that tPVAT is more BAT-like and had divergent phenotype vs. abdominal PVAT (40, 41). tPVAT from BATIRKO; ApoE^{-/-} mice showed a higher proinflammatory profile than ApoE^{-/-} mice, showing high levels of TNF- α and leptin and decreased adiponectin levels. Thus, leptin secreted by PVAT might act in a paracrine way inducing VSMCs proliferation (42) or endothelial dysfunction (43). In addition, TNF- α may contribute to the aortic vascular insulin resistance acting

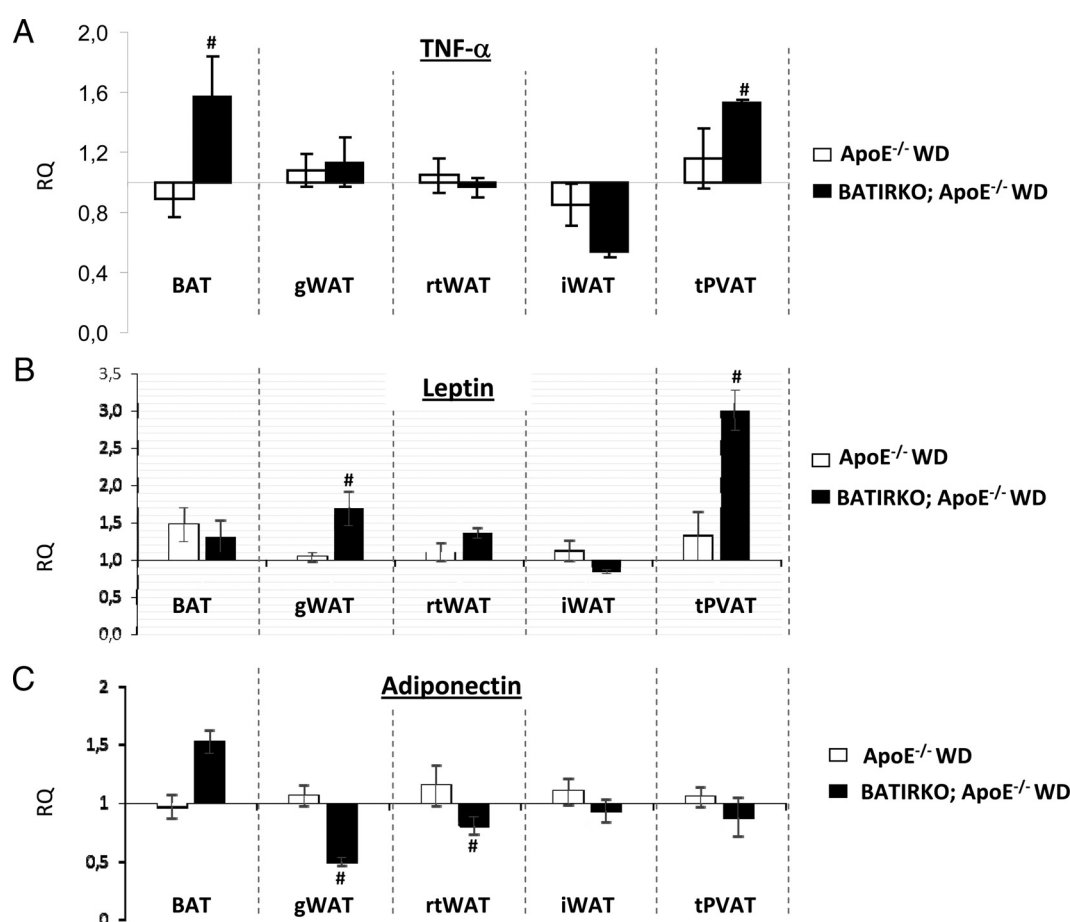


Figure 7. Expression of proinflammatory adipocytokines in adipose tissues from BATIRKO; ApoE^{-/-} model. TNF- α (A), leptin (B), and adiponectin (C) mRNA expression was analyzed by qRT-PCR in BAT, gWAT, rtWAT, iWAT, tPVAT from BATIRKO; ApoE^{-/-} vs. ApoE^{-/-} mice. gWAT: gonadal white adipose tissue; iWAT: inguinal WAT; rtWAT: retroperitoneal WAT; tPVAT: thoracic perivascular adipose tissue; WD: Western type diet. #*P* < .05 vs. ApoE^{-/-} WD. CSTD (n = 10); CWD (n = 10); BWD (n = 10); AEWD (n = 10); B/AEWD (n = 10).

in a paracrine manner or on the tPVAT insulin resistance in an autocrine manner.

In conclusion, our results suggest that severe brown fat lipoatrophy aggravates the atherosclerotic process. Thus, BAT activation might protect against obesity and its associated metabolic and vascular alterations.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: ⁴Almudena Gómez-Hernández, Biochemistry and Molecular Biology II Department, School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Plaza. Ramón y Cajal s/n, Madrid-28040, Spain. Phone: 34-91-3941853; Fax: 34-91-3941779; e-mail: algomez@ucm.es.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

This work was supported by Sources of funding: grants SAF2008/00031 and SAF2011/22555 from MICINN, Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2423) and CIBERDEM is an ISCIII project, Spain.

References

- Barquera S, Pedroza-Tobías A, Medina C, Hernández-Barrera L, Bibbins-Domingo K, Lozano R, Moran AE. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Arch Med Res.* 2015;46:328–38.
- Leon BM, Maddox TM. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes.* 2015;6:1246–58.
- Anderson TJ, Mancini GB, Genest J Jr., Grégoire J, Lonn EM, Hegele RA. The new dyslipidemia guidelines: what is the debate? *Can J Cardiol.* 2015;31:605–12.
- Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem.* 2015;6:209–17.
- Zhang PY, Xu X, Li XC. Eur Rev Cardiovascular diseases: oxidative damage and antioxidant protection. *Med Pharmacol Sci.* 2014;18:3091–6.
- Lazar MA. How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science.* 2005;307:373–375.
- Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;64:355–365.
- Ozen G, Daci A, Norel X, Topal G. Human perivascular adipose tissue dysfunction as a cause of vascular disease: Focus on vascular tone and wall remodeling. *Eur J Pharmacol.* 2015;766:16–24.
- Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006;444:847–853.
- Ghorbani M, Claus TH, Himms-Hagen. Hypertrophy of brown adipocytes in brown and white adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist. *J Biochem Pharmacol* 1997;54:121–131.
- Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest.* 1998;102:412–420.
- Aquila H, Link TA, Klingenberg M. The uncoupling protein from brown fat mitochondria is related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Analysis of sequence homologies and of folding of the protein in the membrane.* *EMBO J.* 1985;4:2369–2376.
- Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma KI, Saito M, Suzuki-Miura T, Wang Z, Sato Y, Mori N, Yamashita H. UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell.* 2005;4:147–155.
- Park A, Kim WK, Bae KH. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells.* 2014;6:33–42.
- Brown NK, Zhou Z, Zhang J, Zeng R, Wu J, Eitzman DT, Chen YE, Chang L. Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1621–30.
- Ozen G, Daci A, Norel X, Topal G. Human perivascular adipose tissue dysfunction as a cause of vascular disease: Focus on vascular tone and wall remodeling. *Eur J Pharmacol.* 2015;766:16–24.
- Omar A, Chatterjee TK, Tang Y, Hui DY, Weintraub NL. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1631–6.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009;360:1509–1517.
- Gómez-Hernández A, Otero YF, de las Heras N, Escibano O, Cachafeiro V, Lahera V, Benito M. Brown fat lipoatrophy and increased visceral adiposity through a concerted adipocytokines overexpression induces vascular insulin resistance and dysfunction. *Endocrinology.* 2012;153:1242–55.
- Escibano O, Guillén C, Nevado C, Gómez-Hernández A, Kahn CR, Benito M. Beta-cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreatic endocrine axis through insulin receptor a isoform. *Diabetes.* 2009;58:820–828.
- Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, Kozak LP, Flier JS. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature.* 1993;366:740–742.
- Poekes L, Lanthier N, Leclercq IA. Brown adipose tissue: a potential target in the fight against obesity and the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond).* 2015 Dec;129:933–491.
- Sanchez-Delgado G, Martinez-Tellez B, Olza J, Aguilera CM, Gil Á, Ruiz JR. Role of Exercise in the Activation of Brown Adipose Tissue. *Ann Nutr Metab.* 2015;67:21–32.
- McMillan AC, White MD. Induction of thermogenesis in brown and beige adipose tissues: molecular markers, mild cold exposure and novel therapies. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2015;22:347–52.
- Sidos LS, Porter C, Saraf MK, Børshiem E, Radhakrishnan RS, Chao T, Ali A, Chondronikola M, Mlcek R, Finnerty CC, Hawkins HK, Toliver-Kinsky T, Herndon DN. Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans alter Severe Adrenergic Stress. *Cell Metab.* 2015;22:219–27.
- Campoli E, Carnevale G, Avallone R, Guerra D, Baraldi M. Morphological and receptorial changes in the epididymal adipose tissue of rats subjected to a stressful stimulus. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19:703–8.
- Warner A, Mittag J. Breaking BAT: can browning create a better white? *J Endocrinol.* 2016;228:R19–29.
- Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, Zhang H, Townsend KL, Shadrach JL, Cerletti M, McDougall LE, Giorgadze N, Tchkonja T, Schrier D, Falb D, Kirkland JL, Wagers AJ, Tseng YH. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:143–8.
- Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, Kaul MG, Tromsdorf UI, Weller H, Waurisch C, Eychmüller A, Gortds PL, Rinninger F, Bruegelmann K, Freund B, Nielsen P, Merkel M, Heeren J. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med.* 2011;17:200–5.

30. Festuccia WT, Blanchard PG, Deshaies Y. Control of Brown Adipose Tissue Glucose and Lipid Metabolism by PPAR γ . *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2:84.
31. Berbée JF, Boon MR, Khedoe PP, Bartelt A, Schlein C, Worthmann A, Kooijman S, Hoeke G, Mol IM, John C, Jung C, Vazirpanah N, Brouwers LP, Gordts PL, Esko JD, Hiemstra PS, Havekes LM, Scheja L, Heeren J, Rensen PC. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat Commun*. 2015;6:6356.
32. Geach T. Dyslipidaemia: Active BAT reduces atherosclerosis. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11:317.
33. Peirce V, Vidal-Puig A. Regulation of glucose homeostasis by brown adipose tissue. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013;1:353–60.
34. Yoneshiro T, Saito M. Activation and recruitment of brown adipose tissue as anti-obesity regimens in humans. *Ann Med*. 2015;47:133–41.
35. Jacene HA, Cohade CC, Zhang Z, Wahl RL. The relationship between patients' serum glucose levels and metabolically active brown adipose tissue detected by PET/CT. *Mol Imaging Biol*. 2011;13:1278–83.
36. Lee P, Greenfield JR, Ho KK, Fulham MJ. A critical appraisal of the prevalence and metabolic significance of brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299:E601–6.
37. Vernochet C, Damilano F, Mourier A, Bezy O, Mori MA, Smyth G, Rosenzweig A, Larsson NG, Kahn CR. Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications. *FASEB J*. 2014;28:4408–19.
38. Apovian CM, Bigornia S, Mott M, Meyers MR, Ulloor J, Gagua M, McDonnell M, Hess D, Joseph L, Gokce N. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:1654–1659.
39. Soret MG, Kupiecki FP, Wyse BM. Epididymal fat pad alterations in mice with spontaneous obesity and diabetes and with chemically induced obesity. *Diabetologia*. 1974;10:639–648.
40. Padilla J, Jenkins NT, Vieira-Potter VJ, Laughlin MH. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;304:R543–52.
41. Gil-Ortega M, Somoza B, Huang Y, Gollasch M, Fernández-Alfonso MS. Regional differences in perivascular adipose tissue impacting vascular homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26:367–75.
42. Miao CY, Li ZY. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol*. 2012;165:643–58.
43. Payne GA, Tune JD, Knudson JD. Leptin-induced endothelial dysfunction: a target for therapeutic interventions. *Curr Pharm Des*. 2014;20:603–8.

ORIGINAL INVESTIGATION

Open Access



Expression of insulin receptor (IR) A and B isoforms, IGF-IR, and IR/IGF-IR hybrid receptors in vascular smooth muscle cells and their role in cell migration in atherosclerosis

N. Beneit^{1,2,3}, C. E. Fernández-García⁴, J. L. Martín-Ventura⁴, L. Perdomo^{1,2,3}, Ó. Escribano^{1,2,3}, J. B. Michel⁵, G. García-Gómez^{1,2,3}, S. Fernández^{1,2,3}, S. Díaz-Castroverde^{1,2,3}, J. Egido^{3,4}, A. Gómez-Hernández^{1,2,3*†} and M. Benito^{1,2,3†}

Abstract

Background: Abnormal proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) is a major contributor to the development of atherosclerotic process. In a previous work, we demonstrated that the insulin receptor isoform A (IRA) and its association with the insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) confer a proliferative advantage to VSMCs. However, the role of IR and IGF-IR in VSMC migration remains poorly understood.

Methods: Wound healing assays were performed in VSMCs bearing IR (IRLoxP^{+/+} VSMCs), or not (IR^{-/-} VSMCs), expressing IRA (IRA VSMCs) or expressing IRB (IRB VSMCs). To study the role of IR isoforms and IGF-IR in experimental atherosclerosis, we used ApoE^{-/-} mice at 8, 12, 18 and 24 weeks of age. Finally, we analyzed the mRNA expression of total IR, IRB isoform, IGF-IR and IGFs by qRT-PCR in the medial layer of human aortas.

Results: IGF-I strongly induced migration of the four cell lines through IGF-IR. In contrast, insulin and IGF-II only caused a significant increase of IRA VSMC migration which might be favored by the formation of IRA/IGF-IR receptors. Additionally, a specific IGF-IR inhibitor, picropodophyllin, completely abolished insulin- and IGF-II-induced migration in IRB, but not in IRA VSMCs. A significant increase of IRA and IGF-IR, and VSMC migration were observed in fibrous plaques from 24-week-old ApoE^{-/-} mice. Finally, we observed a marked increase of IGF-IR, IGF-I and IGF-II in media from fatty streaks as compared with both healthy aortas and fibrolipidic lesions, favoring the ability of medial VSMCs to migrate into the intima.

Conclusions: Our data suggest that overexpression of IGF-IR or IRA isoform, as homodimers or as part of IRA/IGF-IR hybrid receptors, confers a stronger migratory capability to VSMCs as might occur in early stages of atherosclerotic process.

Keywords: Atherosclerosis, Insulin receptor, Migration, Vascular smooth muscle cells

Background

Atherosclerosis is the leading cause of mortality worldwide. The progression of vascular lesions from early fatty

streaks to more advanced plaques is a complex process [1] where vascular smooth muscle cells (VSMCs) plays a main role. The presence of a large number of intimal VSMCs has been taken as evidence that VSMC migration from the media plays an important role in early stages of atherogenesis [2]. These VSMCs that migrated into the intima exhibit an abnormally increased proliferation and extracellular matrix production, leading to the formation of the fibrous cap in atherosclerotic lesions [3]. Growth

*Correspondence: algomezh@ucm.es

†A Gómez-Hernández and M Benito are co-senior authors

¹ Biochemistry and Molecular Biology II Department, School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

factors, including insulin-like growth factors (IGFs), have been implicated in the regulation of VSMC migration [4, 5].

The insulin and IGFs (IGF-I and IGF-II) signaling is mediated by hormone interaction with the insulin receptor (IR) and the IGF-I receptor (IGF-IR) which are members of subclass II of the tyrosine kinase receptor super-family [6, 7]. Both receptors are expressed at the cellular surface as preformed disulfide-linked dimers in $\alpha 2\beta 2$ configuration. The extracellular α subunit of each hemireceptor contains the ligand binding sites, while β subunits include a large cytoplasmic region with tyrosine kinase activity [8]. Because of the high degree of homology of the two receptors, hybrid receptors formed by an IR $\alpha\beta$ -hemireceptor and an IGF-IR $\alpha\beta$ -hemireceptor are also found in cells co-expressing IR and IGF-IR [9–11].

Alternative splicing of the IR gene gives rise two isoforms, IRA and IRB [12], whereas there is only a single isoform of IGF-IR. Indeed, IRB differs from IRA by the inclusion of exon 11 which encodes a 12-amino acid sequence at the C-terminus of the IR α -subunit. The IR isoforms show different functional features. Although both isoforms have similar affinity for insulin, IRA exhibits a higher affinity for IGFs, especially for IGF-II [13], as well as a greater internalization and recycling rate than IRB [14]. Because of these differences, IRB is preferentially associated with metabolic and differentiating signals. Conversely, IRA mainly favors cell growth, proliferation, and survival. In 32D cells, IRA induces mitogenic and antiapoptotic signals in response to IGF-II, whereas IRB tends to send differentiation signals [15]. In mouse beta cell lines, IRA confers a stronger proliferative capacity favoring the mitogenic effects of IGF-I and increasing glucose uptake [16], and it also might provide an explanation for the beta cell hyperplasia induced by liver insulin resistance in iLIRKO mice [17]. Additionally, long-term AAV-mediated hepatic expression of IRA, but not IRB, improves glucose homeostasis in iLIRKO mice, precluding beta cell mass expansion and, therefore, avoiding the final beta cell failure [18]. IRA is also more efficient than IRB at increasing glycogen synthesis, glycogen synthase activity and glycogen storage in hepatocytes and in vivo in the liver [19]. Furthermore, IRA has been reported to be the predominant IR isoform expressed in cancer cells, such as in a variety of carcinomas or breast cancer cell lines [11, 13, 20].

A further understanding of the molecular mechanisms involved in early atherosclerosis is critical for identifying strategies to limit disease progression before it leads to clinical consequences. In this regard, we previously demonstrated that IRA, but not IRB, confers a proliferative advantage to VSMCs in response to several proatherogenic stimuli. Additionally, we found that IRA might

associate with IGF-IR favoring atherogenic actions of IGF-II [21]. However, the specific role of each IR isoform in VSMC migration remains unknown. We therefore analyzed, in the current study, the effect of insulin or IGFs on the migration of murine aortic VSMC lines, as well as the contribution to this process of IR isoforms, IGF-IR and hybrid receptors (IRA/IGF-IR and IRB/IGF-IR). Subsequently, we wondered whether some of the mechanisms studied in vitro could be of any in vivo relevance. For this purpose, we firstly analyzed IRA, IRB and IGF-IR mRNA expression by qRT-PCR in aorta from ApoE^{-/-} mice at 8, 12, 18 and 24 weeks of age. Then, we studied comparatively IR, IGF-IR and α -smooth muscle actin (α -SMA) expression in aortic roots from 8- and 24-week-old ApoE^{-/-} mice. Finally, we analyzed the mRNA expression of total IR, specifically IRB isoform, IGF-IR and IGFs in the medial layer of human aortic segments. Our results strongly suggest that the overexpression of IGF-IR or IRA isoform, as homodimers or as part of IRA/IGF-IR hybrid receptors, confers a migratory advantage to VSMCs that might be of relevance in early stages of atherosclerotic process.

Methods

Tissue samples

Twenty-eight human infradiaphragmatic aortic segments (medial layers of 8 healthy, 9 fatty streaks and 11 fibrolipidic lesions) each harvested from a different donor after organ transplantation with the authorization of the French Biomedicine Agency (authorization number PFS09-007), were included in this study. There were no significant differences in terms of age and gender. The investigation conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

Experimental model

Male mice were maintained in the Animal Care Facility under the standard conditions of temperature and 12 h light/dark cycle. All animals used are under C57BL/6 genetic background. Six week-old male ApoE^{-/-} knockout mice and their control (C57BL/6 mice) were fed a Western type diet (A04+ 21% kcal from fat) for 2, 6, 12 or 18 weeks respectively. All animal experimentation described in this manuscript was conducted according with accepted standards of human animal care, as approved by the corresponding institutional committee. The investigation also conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996) and in accordance with The ARRIVE Guideline for Reporting Animal research.

Plasma levels of insulin were analyzed using ELISA kits (Millipore). Cholesterol and triglycerides were tested in

plasma samples from fasted mice (Spinreact, Barcelona, Spain). Blood glucose level was determined in fasted animals using an automatic monitor (Roche Molecular Biochemicals GmbH, Mannheim, Germany).

Cell cultures

Generation of immortalized IRLoxP^{+/+}, IR^{-/-}, IRA and IRB VSMC lines was previously described [17]. Briefly, primary VSMCs were obtained from thoracic aorta arteries of 3 male 8-week-old IRLoxP^{+/+} mice. Anesthetized mice (Avertin, 250 mg/kg, ip) were saline perfused and thoracic aorta arteries were submitted to collagenase dispersion and primary culture. Then, primary culture of IRLoxP^{+/+} VSMCs were immortalized by transfection with pBabe retroviral vector encoding SV40 Large T antigen and selected with 1 µg/mL puromycin for 3 weeks. Immortalized IRLoxP^{+/+} VSMCs were infected with adenoviruses encoding Cre recombinase to obtain IR^{-/-} VSMCs. Finally, IR^{-/-} VSMCs were transfected with pBABE retroviral vector encoding the individual spliced isoforms of the human IR, IRA or IRB, and selected with 200 µg/mL hygromycin for 2 weeks to obtain IRA or IRB VSMCs respectively.

Four cell lines were cultured to subconfluence (70–80%) with 10% (fetal bovine serum) FBS-DMEM for signaling studies and were serum and glucose starved for 4–5 h and then stimulated with insulin (10 or 100 nmol/L, Sigma-Aldrich Corp.), IGF-I (10 nmol/L, Millipore) or IGF-II (10 nmol/L, Millipore).

Western blot analysis

Western blot analyses were performed on protein extracts from VSMCs as previously described [17]. The antibodies used were anti-IRβ and anti-IGF-IRβ from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA); anti-β-actin from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO); anti-phospho-Akt (Thr308), anti-phospho-p70 S6 Kinase (Ser389) and anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) from Cell Signaling (Danvers, MA, USA).

Wound healing assays

Cells were cultured to confluence in 10% FBS-DMEM and serum deprived for 18 h. Then, the confluent monolayer was scratched with a sterile pipette tip and cells were washed twice with PBS and fresh medium was added. Cells were stimulated with insulin (10 nmol/L), IGF-I (10 nmol/L) or IGF-II (10 nmol/L) and maintained for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Migration was followed by phase-contrast microscopy (Eclipse TE300 Nikon microscope coupled to a digital sight DS-U2 camera) at different time points (0, 6, 12 and 24 h) up to wound healing closure. Photographs were taken to quantify (using

TScratch program) the percentage of wound healing closure at the different time points in relation to time 0.

RNA extraction and real-time quantitative polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from tissue samples using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and quantified by absorbance at 260 nm. One microgram of RNA was used to perform the reverse transcription with a High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was performed on an ABI Prism 7500 sequence detection PCR system (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol, using the $\Delta\Delta C_t$ method as previously described [17]. Quantification of IGF-IR, and IRA and IRB isoform mRNA levels in aorta from experimental model were performed by amplification of cDNA with TaqMan probes. The quantification of human IR, IRB isoform, IGF-IR, IGF-I and IGF-II mRNA levels was performed by amplification of cDNA using SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc., Otsu, Japan). The mRNA levels of target genes were normalized to 18S mRNA content. Thus, the amount of target, normalized to 18S and relative to the control, is given by real-time quantitative (RQ) = $2^{-\Delta\Delta C_t}$; ΔC_t (cycle threshold) = C_t (target gene) – C_t (18S); $\Delta\Delta C_t$ = ΔC_t for any sample – ΔC_t for the control. Sequences of primers are the following: IR: forward primer: 5'-CGAGAAGACCA TCGACTCGG-3' and reverse primer 5'-GACACCA-GAGCGTAGGATCG-3'; IRB: forward primer: 5'-GAGG ATTACCTGCACAACGTG-3' and reverse primer 5'-TAG GGTCTCGGCACCAG-3'; IGF-IR: forward primer: 5'-ATGCGGTGTCCAATAACTAC-3' and reverse primer 5'-TTGTTGATGGTGGTCTTCTC-3'; IGF-I: forward primer: 5'-TTTCAACAAGCCCACAGGGT-3' and reverse primer 5'-TTGAGGGGTGCGCAATACAT-3'; IGF-II: forward primer: 5'-GTCATGGCAGACGCCACATT-3' and reverse primer 5'-CGAAGGCTCTGCCCTTCTTA-3'; and Housekeeping gene as 18S: forward primer: 5'-CCGTCG-TAGTTCCGACCATAA-3' and reverse primer 5'-CAGCTTTGCAACCATACTCCC-3'.

Histological analysis

Aortic roots were OCT-embedded and sections of 7 µm interval were Oil-Red-O/hematoxylin stained to measure lipid depot. The lesion size on aortic root was measured as described [21]. IR and IGF-IR were detected by immunoperoxidase with rabbit anti-IRβ (sc-711) and anti-IGF-IRβ (sc-713) polyclonal antibodies. We also measured α-SMA with Anti-Actin, α-Smooth Muscle-Cy3™ antibody, mouse monoclonal (C6198, Sigma-Aldrich) to localize smooth muscle cells in aortic roots and check whether such cells had migrated from media

to intima. To localize smooth muscle cells with positive staining for IR or IGF-IR, we performed immunofluorescence against IR or IGF-IR using anti-rabbit FITC (green staining) followed by immunofluorescence against Anti-Actin, α -Smooth Muscle-Cy3™ antibody (red staining) and finally, incubation with DAPI to stain nuclei (blue staining).

Gelatin zymography

To determine MMP-2 and MMP-9 activities, 80% confluent cells were serum-deprived for 12–24 h and the culture medium of different experimental conditions was used for an electrophoresis in 10% SDS–polyacrylamide gels polymerized in the presence of 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich) under non-reducing conditions. Gels were washed with 2.5% Triton X-100 for 30 min to remove SDS, rinsed with substrate buffer (0.2 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 1% Triton X-100, 0.02% NaN₃, 50 mM Tris pH 7.5) and incubated in this buffer at 37 °C overnight to allow protein renaturation and MMP activation. To visualize gelatin degradation, gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) for 60 min. MMP-2 and MMP-9 activities were quantified by Image J Program.

Statistical analysis

All values are expressed as mean \pm SEM. Differences between two groups were assessed using unpaired two-tailed *t*-tests. Data involving more than two groups were analyzed using a one-way ANOVA followed by a Bonferroni test if differences were noted (GraphPad Prism). The null hypothesis was rejected when $p < 0.05$.

Results

Differential insulin and IGFs signaling by IRA or IRB isoforms in VSMCs

To study the role of IR isoforms in the migration of vascular smooth muscle cells four murine aortic VSMC lines were used: bearing IR (IRLoxP^{+/+} VSMCs), lacking IR (IR^{-/-} VSMCs), specifically expressing IRA isoform (IRA VSMCs) or alternatively expressing IRB isoform (IRB VSMCs). Western blot analysis of IR β confirmed deletion in IR^{-/-} VSMCs and expression of IR in reconstituted IRA and IRB VSMC lines (Additional file 1: Figure S1A). Regarding IGF-IR, a significantly higher expression was found in IR^{-/-} and IRB VSMCs compared to IRLoxP^{+/+} VSMCs, while cells exclusively expressing IRA showed lower level of IGF-IR protein (Additional file 1: Figure S1A).

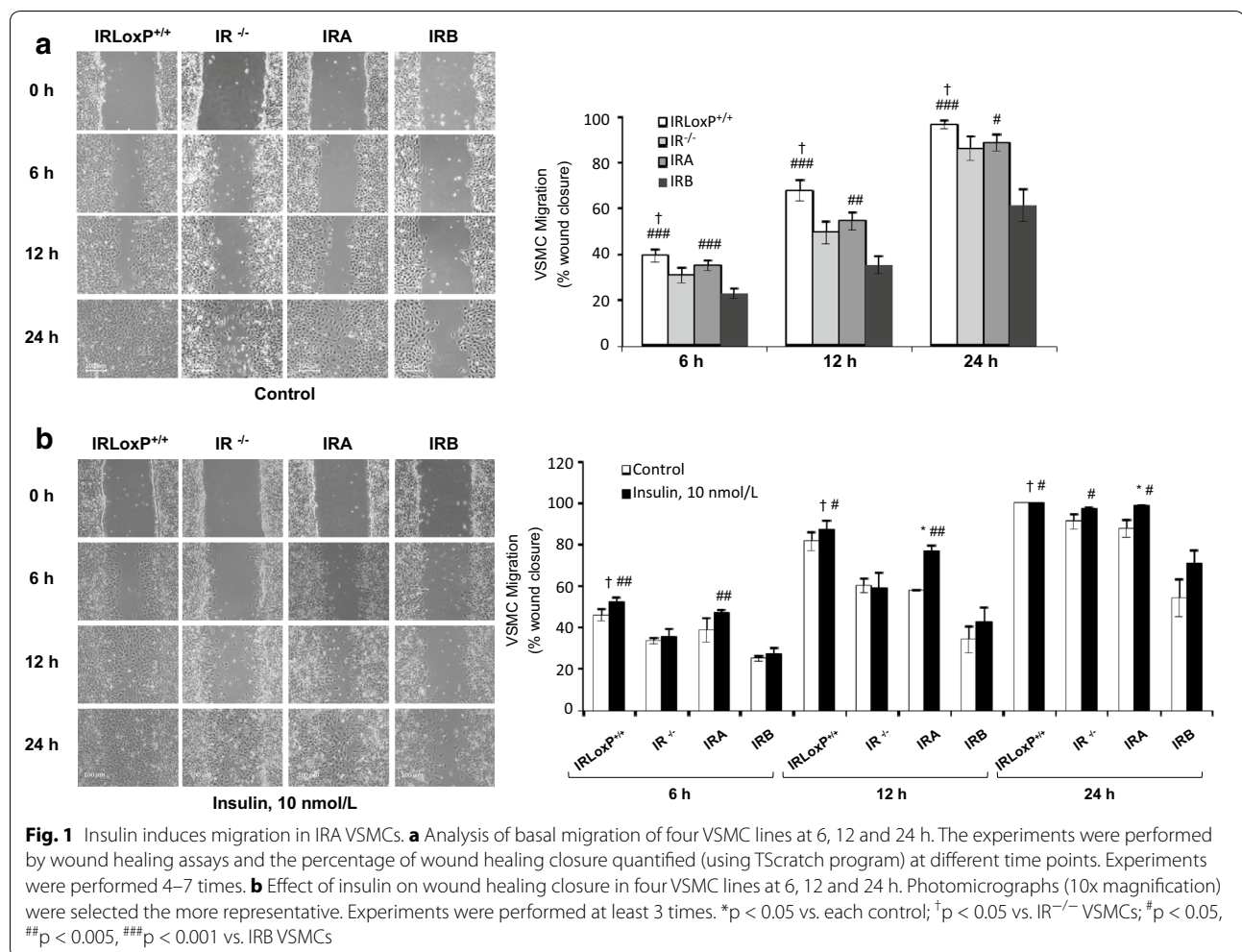
We studied the signaling pathways induced by insulin or IGFs. Cells were stimulated with 10 nmol/L insulin, IGF-I or IGF-II for 10 min and phosphorylation of Akt, p70S6 K and p44/42 MAPK was analyzed. As expected,

IR^{-/-} VSMCs responded to IGFs, but did not to insulin, in regards to Akt activation. However, a significant increase of p-Akt, p-p70S6 K, and p-p44/42 MAPK was induced by the three stimuli in IRLoxP^{+/+} VSMCs (Additional file 1: Figure S1B). More importantly, IRA VSMCs showed a significantly higher activation of Akt, p70S6 K and p44/42 MAPK in response to insulin, IGF-I or IGF-II, than in IRB VSMCs (Additional file 1: Figure S1B).

Differential contribution of IRA, IRB and IGF-IR to VSMC migration in response to insulin or IGFs

Proliferation and migration of VSMCs contribute to atherosclerotic process. In this regard, we previously demonstrated that IRA isoform confers a proliferative advantage to those cells [17]. Then, we hypothesized that a differential role of IR isoforms might also occur in the migration of VSMCs. To address this issue, we measured the migration rate of four VSMC cell lines at 6, 12 and 24 h by wound healing assays. Maximal migration was observed in IRLoxP^{+/+} VSMCs as compared with IR^{-/-} and IRB VSMCs. IRA VSMCs showed a significantly higher migration than IRB VSMCs (Fig. 1a). Moreover, we assessed the effect of insulin or IGFs stimulation on VSMC migration. Firstly, we found a significant increase of insulin-induced migration in IRA VSMCs at 12 and 24 h after wounding. IRLoxP^{+/+} and IRB VSMCs exhibited a slightly response to insulin and no effect was observed in IR^{-/-} VSMCs (Fig. 1b). IGF-I strongly induced migration of all cell lines studied with significant increases in the percentage of wound closure at 12 and 24 h (Fig. 2a). Given the fact that IGF-I enhanced migration of cells lacking IR, the effect exerted by IGF-I might be mediated through IGF-IR. In contrast, IGF-II showed a discrete effect on VSMC migration. However, IGF-II induced IRA VSMC migration significantly faster than IRB VSMCs at 12 h (Fig. 2b). These results suggest a differential contribution of IR and IGF-IR to VSMC migration, the latter being the main mediator of IGF-I-induced migration. Conversely, insulin and IGF-II seem to require IR, and more specifically IRA isoform, to induce migration of VSMCs.

One of the mechanisms that may also partially explain the differential migration between IRA and IRB VSMCs is a differential activation of certain matrix metalloproteinases (MMPs), specifically the gelatinases such as MMP-2 and MMP-9, which have been involved in VSMC migration [22–24]. Thus, we observed by gelatin zymography that MMP-2 activity was much higher in IRA than IRB VSMCs under basal conditions or upon stimulation with insulin, IGF-I or IGF-II for 12 and 24 h (Additional file 2: Figure S2).



Inhibition of IGF-IR strongly reduces VSMC migration

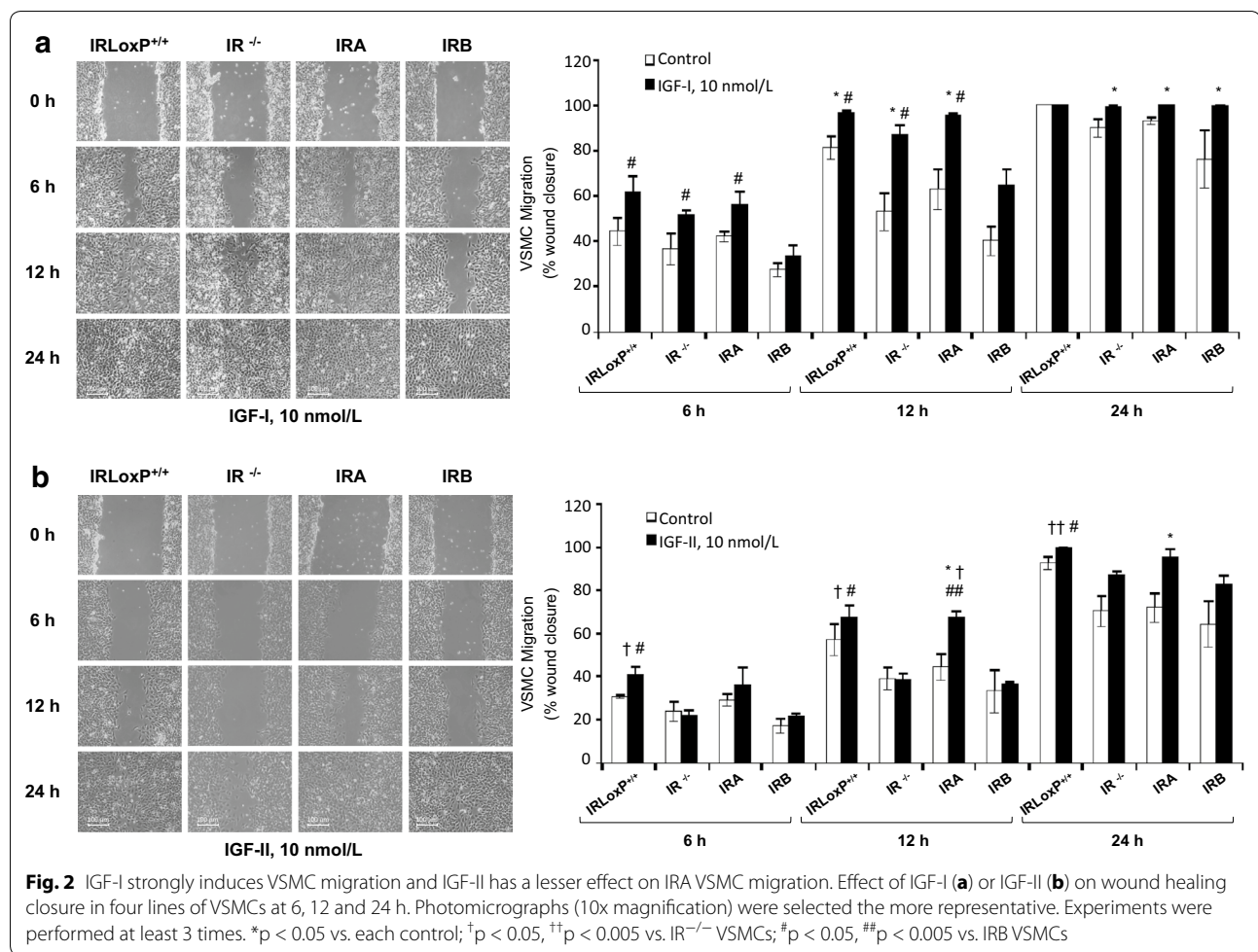
To further investigate the role of IGF-IR in VSMC migration, we utilized a highly specific inhibitor of IGF-IR tyrosine phosphorylation, picropodophyllin (PPP), without affecting IR. A PPP dose–response curve revealed a complete inhibition of IGF-IR phosphorylation at 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ in IRLoxP^{+/+} VSMCs upon stimulation with IGF-I. Similarly, 5 $\mu\text{mol/L}$ PPP completely avoided IGF-IR tyrosine phosphorylation in all others cell lines (Fig. 3a). Therefore, cells were treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ PPP for 12 h to address migration experiments. We found a notable and significant decrease of VSMC migration induced by PPP treatment, reaching roughly 50% of inhibition in all the four cell lines migration (Fig. 3b). These data indicate that IGF-IR mostly contributes to VSMC migration under basal conditions.

A step further, we studied the effect of IGF-IR inhibition on the VSMC migration stimulated by insulin or IGFs. Interestingly, PPP treatment completely abolished insulin-induced migration in IRB VSMCs, whereas

migration of IRLoxP^{+/+} or IRA VSMCs was partially inhibited (Fig. 4a), suggesting that IRB, but not IRA, requires the presence of IGF-IR to induce migration in response to insulin. Regarding IGF-I-mediated migration, a reduction of approximately one half was the result of IGF-IR inhibition in all cell lines analyzed and no significant differences were noted between IRA and IRB VSMCs (Fig. 4b). Finally, PPP caused a much higher inhibition of IGF-II-induced migration in IRB VSMCs than that observed in IRLoxP^{+/+} or IRA VSMCs (Fig. 4c).

Insulin and IGF-II induces the formation of IRA/IGF-IR hybrid receptors in VSMCs

To address the issue of hybrid receptor formation, lysates from IRLoxP^{+/+}, or IRA, or IRB VSMCs, were immunoprecipitated with anti-IR β antibody followed by Western blot against IGF-IR. All cell lines showed a basal association between IR and IGF-IR. Nevertheless, expression of IRA/IGF-IR hybrid receptors was significantly increased only in IRA VSMCs upon stimulation with insulin or



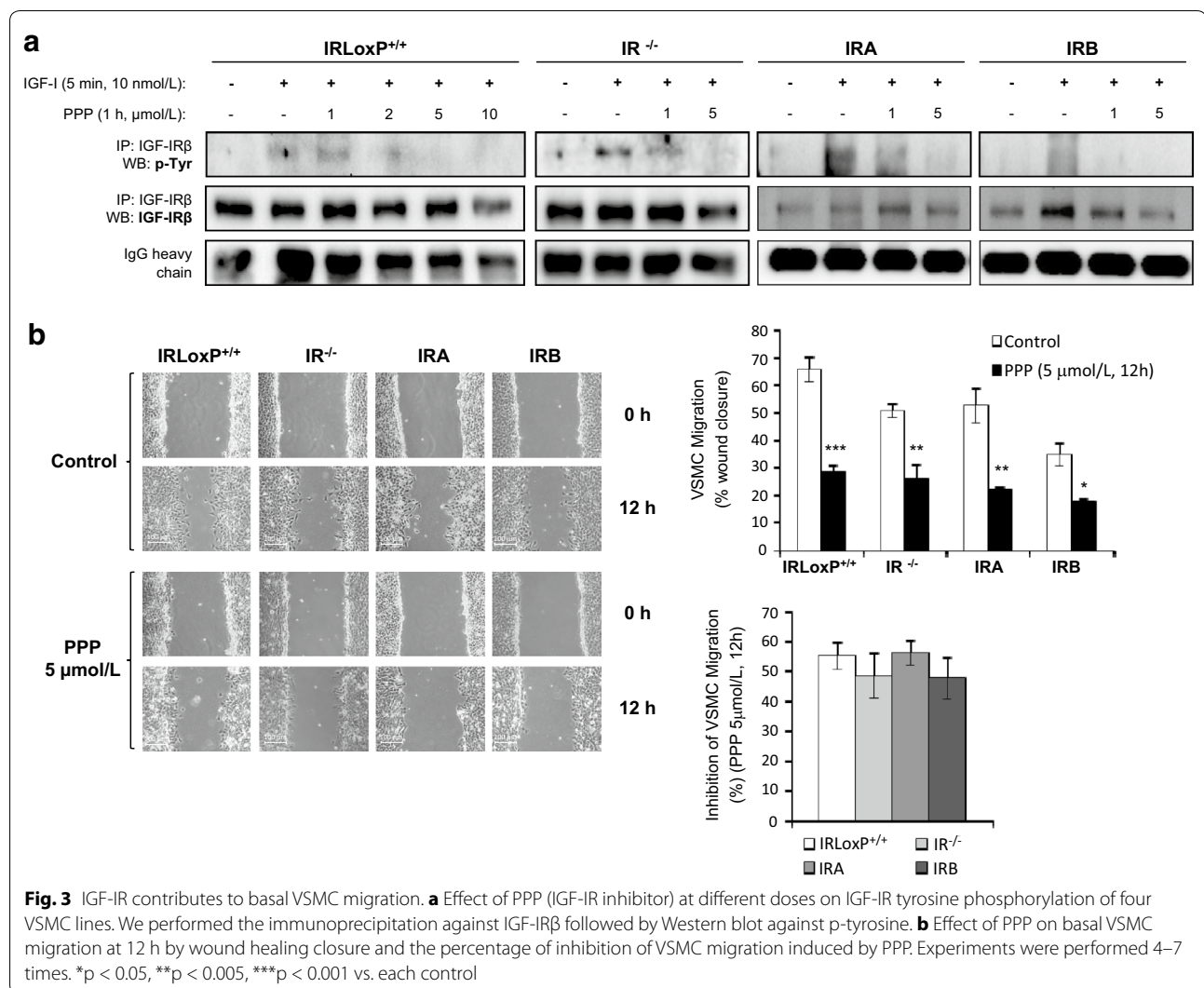
IGF-II, but not with IGF-I, for 12 h (Fig. 4d). In addition, expression of both IR and IGF-IR was measured in total protein extracts and detected an increase of IRA isoform, with an equal expression of IGF-IR, in response to insulin or IGF-II (Additional file 3: Figure S3). These findings are consistent with the greater migration observed in IRA VSMCs upon stimulation with insulin or IGF-II for 12 h (Figs. 1b, 2b).

Role of IR isoforms and IGF-IR in VSMC migration in an experimental model of atherosclerosis

To assess the role of IR isoforms and IGF-IR in experimental atherosclerosis, we used ApoE^{-/-} mice at 8, 12, 18 and 24 weeks of age. This model showed hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia at all weeks of age without alterations in body weight, glucose or insulin plasma levels (see Table 1).

Firstly, we studied the mRNA expression of IR isoforms and IGF-IR by qRT-PCR in aorta. A significant increase of IRA and IGF-IR mRNA was noted in 24-week-old

ApoE^{-/-} mice. However, IRB was diminished in aorta from ApoE^{-/-} mice at all weeks of age (Fig. 5a). After that, we studied the lesion area and lipid deposits together with IR and IGF-IR protein levels only in aortic roots from 8- and 24-week-old ApoE^{-/-} mice and their respective controls, because it was previously described that at 15–20 weeks of age, ApoE^{-/-} mice might have fibrous plaques in which the presence of a fibrous cap containing VSMCs would indicate their migration from the media [25]. A progression of atherosclerosis was observed by OilRedO staining as a progressive increase of lesion area, stenosis and lipid deposits in aortic roots from 24-week-old ApoE^{-/-} vs. 8-week-old ApoE^{-/-} mice (Fig. 5b). By immunohistochemistry against total IR, we found a significant decrease of IR in aortic roots from 8-week-old ApoE^{-/-} mice (Fig. 5b), consistent with the decreased mRNA expression of both IRA and IRB isoforms in aorta from ApoE^{-/-} mice at 8 weeks of age (Fig. 5a). In aortic roots from 24-week-old ApoE^{-/-} mice, protein levels of total IR were similar to their controls



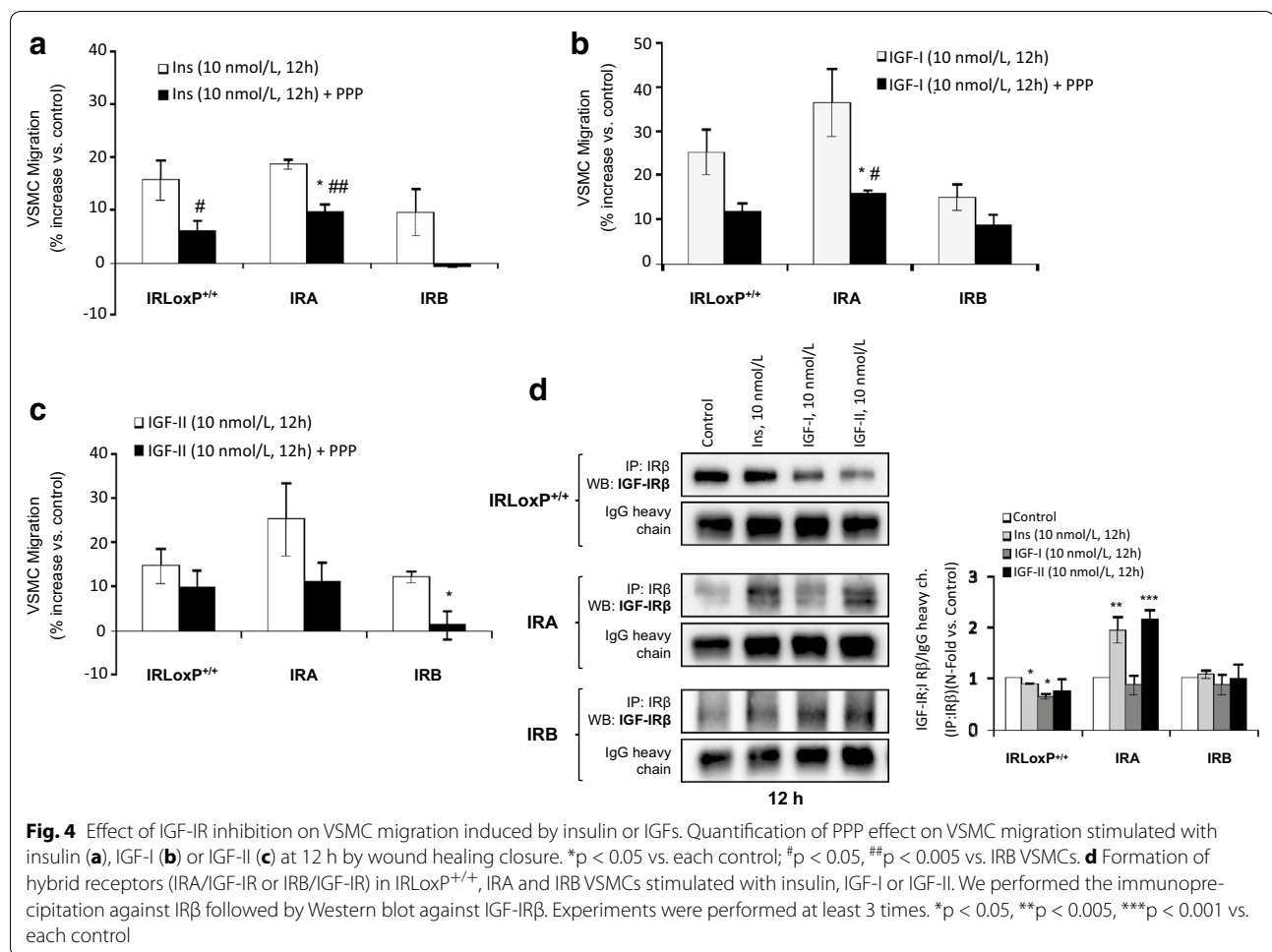
(Fig. 5b), and this can be correlated with the increased expression of IRA at mRNA level, together with the decreased expression of IRB mRNA (Fig. 5a). In addition to the increased IGF-IR mRNA levels, a significant increase of IGF-IR protein was observed in aortic roots from ApoE^{-/-} mice at 24 weeks of age (Fig. 5a, b). However, besides VSMCs, many inflammatory cells can be present in those plaques and they might also express IR or IGF-IR.

In order to localize VSMCs in aortic roots, we checked by immunofluorescence the expression of α -SMA, a well-known marker of smooth muscle cells. Very similar levels of α -SMA were found in aortic roots from ApoE^{-/-} mice at 8 and 24 weeks of age in relation to their respective controls (Fig. 6a). We also observed medial VSMCs migrated into the intima of fibrous plaques from 24-week-old ApoE^{-/-} mice (see white arrows of Fig. 6a). Moreover, by double immunofluorescence against IR or

IGF-IR and α -SMA (Fig. 6b), we found that those VSMCs present in fibrous plaques from 24-week-old ApoE^{-/-} mice expressed IR or IGF-IR (see arrows and merged of Fig. 6b).

mRNA expression of IGF-IR and IGFs in human aortic medial layers

Based in our in vitro and in vivo results and those previously published in ApoE^{-/-} or BATIRKO mice, two models showing vascular damage [21], we hypothesized that IR and its isoforms and IGF-IR could play a differential role in human early atherosclerosis. For this purpose, we analyzed the mRNA expression of total IR, specifically IRB isoform, IGF-IR and IGFs by qRT-PCR in the medial layer of human aortas (Additional file 4: Figure S4). Among 28 aortic samples, 8 were devoid of grossly visible signs of lesions and were classified as healthy, whereas all other samples showed macroscopic

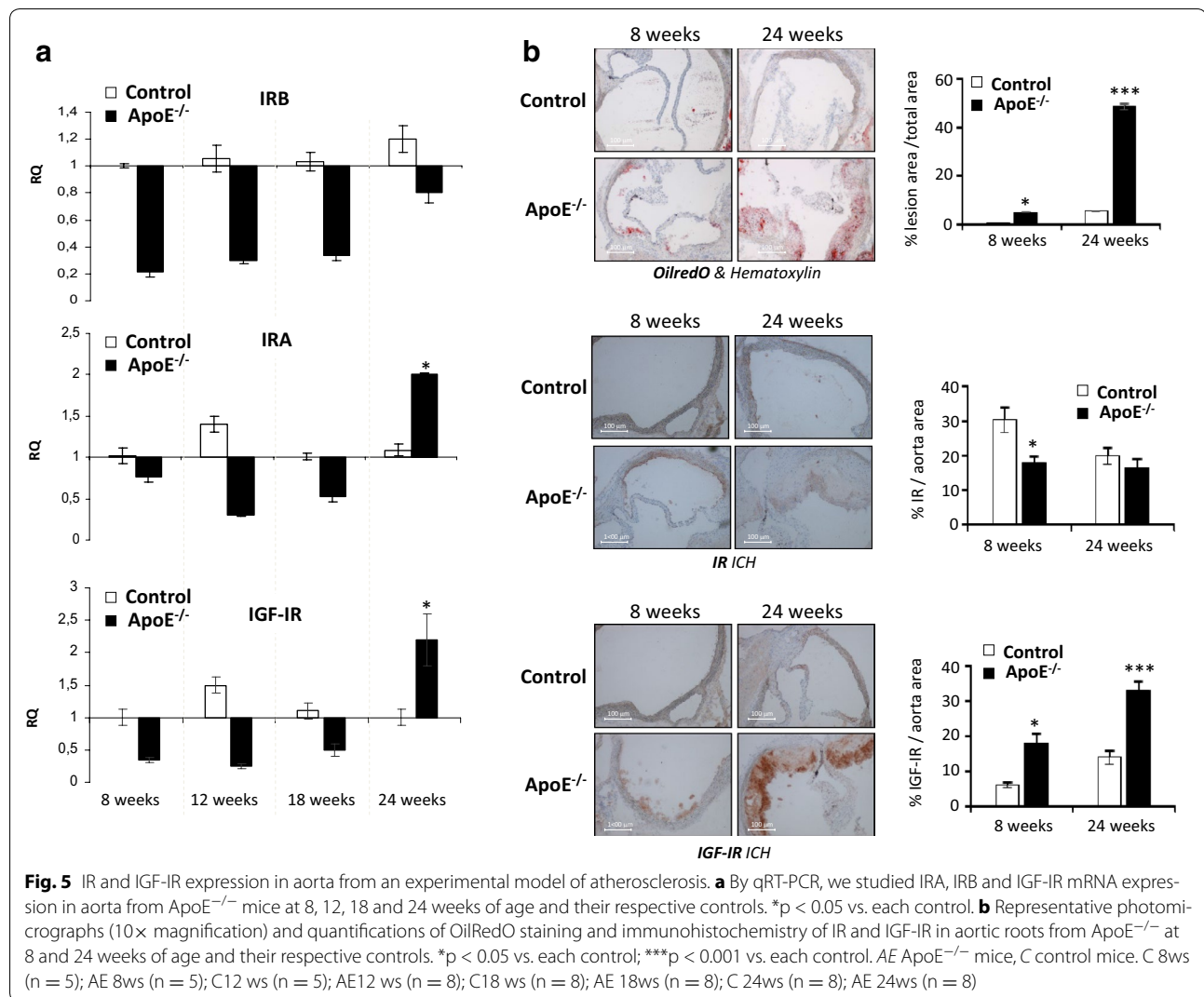
**Table 1** Characterization of an experimental model of atherosclerosis

	8 weeks		12 weeks		18 weeks		24 weeks	
	Control (n = 5)	ApoE ^{-/-} (n = 5)	Control (n = 8)	ApoE ^{-/-} (n = 8)	Control (n = 8)	ApoE ^{-/-} (n = 8)	Control (n = 8)	ApoE ^{-/-} (n = 8)
Body weight (g)	20.4 ± 0.1	21.3 ± 0.6	24.7 ± 0.5	24.3 ± 0.5	27.7 ± 1	26.5 ± 0.3	28.3 ± 1	30.5 ± 1
BAT (mg)/BW (g)	3.9 ± 0.02	2.8 ± 0.6	4.3 ± 0.4	3.7 ± 0.4	4.1 ± 0.7	3.0 ± 0.1	4.7 ± 0.5	3.4 ± 0.5
WAT (mg)/BW (g)	10.5 ± 0.8	11 ± 0.6	12.2 ± 2.7	17 ± 0.2	14.7 ± 2	17.5 ± 1	22 ± 4	27 ± 1
Glucose (mg/dL)	80.5 ± 6.5	79 ± 13	83 ± 4	104 ± 15	110.9 ± 12	106 ± 4	117 ± 1	101 ± 11
Insulin (ng/mL)	0.24 ± 0.003	0.3 ± 0.1	0.25 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.35 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.3 ± 0.01
Cholesterol (mg/dL)	79.1 ± 13	461 ± 39*	109.4 ± 8.4*	565.3 ± 48.8*	122.05 ± 12*	569.8 ± 18*	120 ± 5*	603.9 ± 31**
TG (mg/dL)	43.4 ± 1.6	53.9 ± 25*	36.6 ± 5	56.9 ± 8*	62.3 ± 12	73.2 ± 5*	57.2 ± 8	110 ± 12**

Male ApoE^{-/-} mice were fed with Western type diet since 6 week of age for 2 weeks (control and ApoE^{-/-} at 8 weeks of age), 6 weeks (control and ApoE^{-/-} at 12 weeks of age), 12 weeks (control and ApoE^{-/-} at 18 weeks of age) or 18 weeks (control and ApoE^{-/-} at 24 weeks of age). We measured the body weight, BAT (mg)/BW (g), WAT (mg)/BW (g), glucose, insulin, cholesterol and triglycerides plasma levels the same day of sacrifice in fasted mice. ApoE^{-/-} mice at all weeks of age showed hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia and the other parameters with no significant differences in relation to each their controls

BW/body weight, BAT brown adipose tissue, WAT white adipose tissue, TG triglycerides

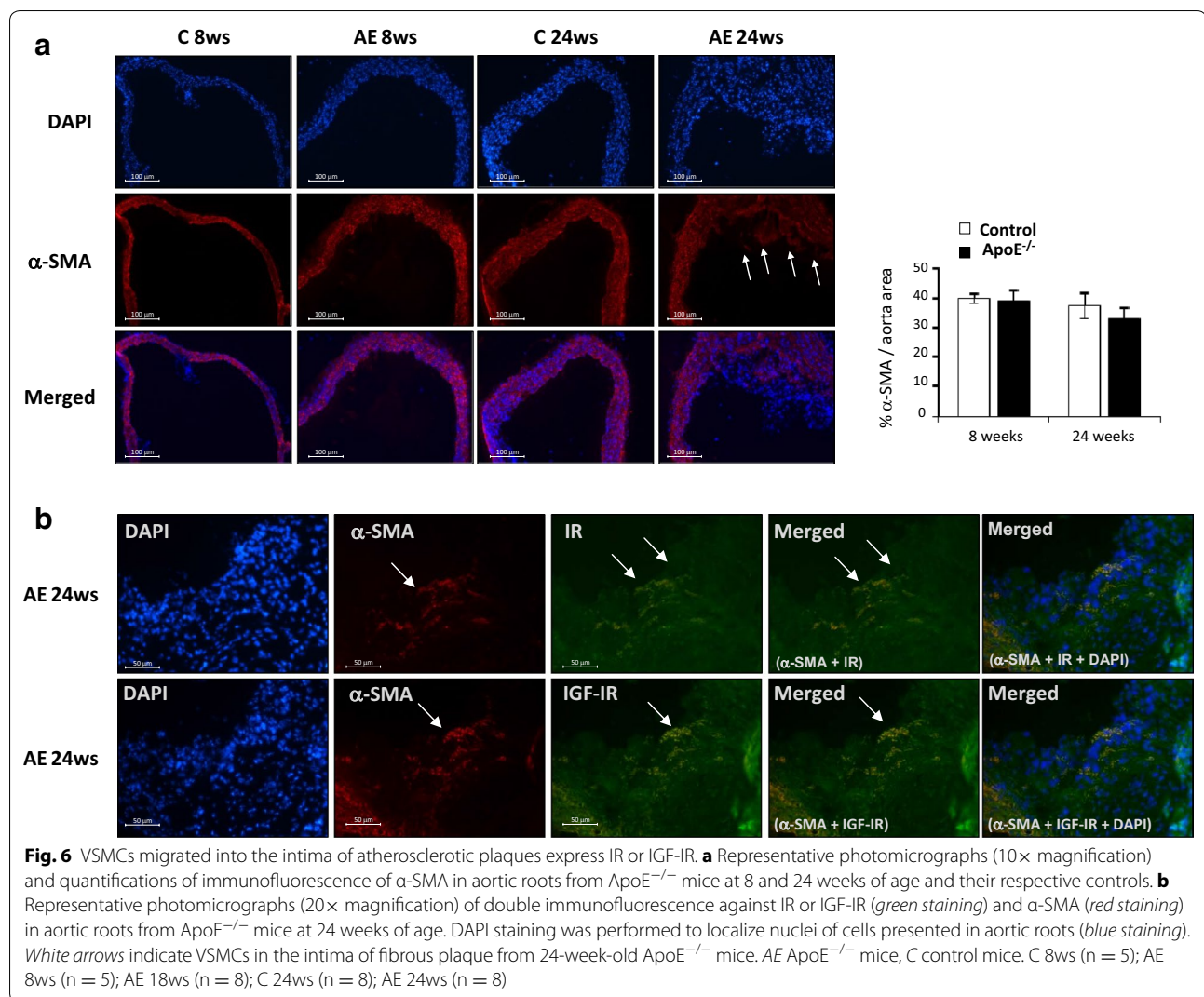
* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ vs. each control



features of early atheromatous lesions, including 9 fatty streaks and 11 fibrolipidic lesions. We found that total IR mRNA expression was significantly lower in media from fibrolipidic lesion-bearing aortas as compared to healthy aortas. However, no significant changes were observed when we analyzed specifically IRB mRNA level. More importantly, a marked and significant increase in gene expression of IGF-I and IGF-IR was observed in medial layer from aortas bearing fatty streaks when compared with healthy aortas and fibrolipidic lesions. Furthermore, IGF-II mRNA expression was notably higher in fatty streaks than in healthy aortas and fibrolipidic lesions. These results strongly suggest that increased expression of IGF-IR and IGFs in tunica media, mainly composed of VSMCs, might contribute to migration of those cells into the intima.

Discussion

Vascular injury results in changes in the vascular smooth muscle cell environment, including increases in growth factor availability and cell alterations, leading to proliferation and migration of VSMCs and thereby to an organized atherosclerotic plaque [26]. Consequently, elucidating the underlying regulators of these processes could provide a novel therapeutic strategy targeting VSMCs to prevent atherosclerotic progression and its clinical consequences. In the present paper, we addressed the issue of a better understanding of molecular mechanisms involved in VSMC migration, specifically the part played by IR isoforms and IGF-IR in this process. We used four aortic VSMC lines: IRLoxP^{+/+} VSMCs (bearing IR), IR^{-/-} VSMCs (lacking IR), IRA VSMCs (expressing IRA isoform) and IRB VSMCs (expressing IRB



isoform) and we firstly studied the activation of PI3 K/ Akt or MAPK, the major signaling pathways by which insulin and IGFs exert their effects on cellular metabolism, growth and survival [27]. We previously described that insulin induced a more sustained signaling in IRA compared with IRB neonatal pancreatic beta cell lines [28] and a higher stimulation of Akt or MAPK pathways in IRA than IRB VSMCs [21]. Now, we show that IRA isoform in VSMCs mediates a greater activation of Akt, p70S6K and p44/42 MAPK than IRB in response not only to insulin, but also to IGFs. Furthermore, phosphorylation of those kinases was highly pronounced when IRA VSMCs were stimulated with IGFs, especially with IGF-II. In this regard, IRA has been reported to exhibit high affinity for insulin, intermediate affinity for IGF-II and low affinity for IGF-I, whereas IRB is a highly specific receptor for insulin [13]. Moreover, in mouse fibroblast expressing only IRA and not IGF-IR, despite producing

a lower IRA autophosphorylation than insulin, IGF-II induced a higher p70S6K/Akt activation ratio compared with insulin. IGF-I elicited a similar signaling pattern than IGF-II, although it binds IRA with much lower affinity than IGF-II [29].

Type 2 diabetes and the metabolic syndrome are well known risk factors for atherosclerosis in part due to insulin resistance and/or hyperinsulinemia [30, 31]. Additionally, accelerated atherosclerosis in diabetic patients has been associated with the fact that diabetic VSMCs exhibit significantly increased rates of proliferation, adhesion and migration [32]. In this sense, several authors have examined the effect of insulin on VSMC migration, but the results are controversial. Yang and Kahn reported that physiological concentrations of insulin did not affect the migration of cultured rat VSMC, but increased it when cells were also stimulated with Ang II or inhibited it in the presence of NO [33]. Furthermore, in bovine aortic

VSMCs 10 nmol/L insulin moderately stimulated migration mainly through the MAPK pathway, whereas insulin maintained VSMC quiescence and differentiation via PI3K-dependent signaling [34]. In others studies, a high dose of insulin (100 nmol/L) was found to induce migration and proliferation of both human and rat VSMCs [35, 36]. Nevertheless, this supraphysiological concentration of insulin can stimulate IGF-IR, which is known to mediate VSMC migration [4]. In our work, migration studies showed that insulin stimulation led to a higher increased migration in IRA than IRB VSMCs and had no effect on IR^{-/-} VSMCs, indicating that insulin exerts its effect on VSMC migration by binding IR, mainly IRA isoform. IGF-I, by contrast, strongly promoted the migration of VSMCs and this effect appears to be mediated mainly through IGF-IR, since a significant increase in migration was observed in cells lacking IR. Consistent with this, it is well established that IGF-I is a potent stimulator of VSMC proliferation and migration as a result of binding its own receptor [4, 37, 38]. IGF-II has also been found to induce migration in VSMCs through IGF-IR, but it was sixfold less potent than IGF-I [4]. Because IGF-II stimulated migration only in IRA VSMCs, our findings indicate that IGF-II requires the presence of IRA isoform, as homodimers or as part of IRA/IGF-IR hybrid receptors, to induce the migration of VSMCs.

Migration assays in the presence of PPP, a highly specific inhibitor of IGF-IR, demonstrated the implication of this receptor in VSMC migration. PPP specifically blocks phosphorylation of tyrosine 1136 in the IGF-IR activation loop, which is necessary for autophosphorylation of others tyrosine residues of the β subunit, but do not interfere with IR activity [39, 40]. We found that IGF-IR inhibition abolished insulin- and IGF-II-induced migration in IRB VSMCs, whereas migration of IRA VSMCs was partially inhibited. However, IGF-I-stimulated migration was inhibited by PPP at a similar level in both IRA and IRB cell lines. Taking into account that IR/IGF-IR hybrid receptor autophosphorylation occurs by an intramolecular transreaction in which both β subunits transfer phosphate to each other [41], it might be considered that signal transduction through hybrid receptors, like IGF-IR homodimers, is prevented with PPP treatment. Therefore, remaining migration when IGF-IR phosphorylation was inhibited appears to be mediated by IRA, but not by IRB homodimers, upon stimulation with insulin or IGF-II.

Other authors have described the presence of IR/IGF-IR hybrid receptors in human or rat VSMCs [42, 43], and we have previously demonstrated that both IRA/IGF-IR and IRB/IGF-IR hybrid receptors are expressed in our VSMC lines [21]. Insulin and IGFs are able to stimulate IRA/IGF-IR hybrid receptors, although insulin is less effective. Regarding IRB/IGF-IR activation, insulin and IGF-II are much less effective than IGF-I [44]. We currently describe

that IRA expression and thereby IRA/IGF-IR hybrid receptor formation, are increased by insulin or IGF-II, and this might favor the migration of VSMCs.

Human atherosclerotic disease has been histologically classified by the AHA into eight types of lesions, from early lesions, including initial and fatty streak lesions, to advanced atherosclerotic lesions [45]. In early atherosclerotic lesions, IGF-IR might contribute to atherosclerotic progression by mediating proatherogenic actions of IGFs. Other studies have described an increased level of IGF-IR expression in VSMCs of atherosclerotic plaques of rabbit aortas [46], as we have observed in both aorta and aortic roots from ApoE^{-/-} mice at 24 weeks of age. Moreover, increased IGF-IR and IGF-I mRNA transcripts were observed in asymptomatic than in symptomatic plaque VSMCs [47]. In contrast, IGF-IR and IGF-I are decreased in advanced atherosclerotic plaques and this is consistent with the increased apoptotic rates of VSMCs, potentially leading to plaque weakening, plaque rupture and acute coronary events [48, 49]. In the same way, a recent study showed that a monocyte/macrophage specific IGF-IR knockout mice on ApoE^{-/-} background significantly increased atherosclerotic lesion formation and changed plaque composition to a less stable phenotype [50]. Regarding IGF-II, it has been described as a pivotal promoter of growth of the atherosclerotic lesion in ApoE^{-/-} mice and local overexpression of IGF-II can induce the appearance of aortic focal intimal masses [51]. In this sense, we describe that IRA isoform expression is significantly increased in aorta from 24-week-old ApoE^{-/-} mice, which it might favor proatherogenic actions of IGF-II. Consistently, we show for the first time that gene expression of IGF-I, IGF-II and IGF-IR is notably increased in the medial layer, mainly composed of VSMCs, of human aortas bearing early atherosclerotic lesions. Additionally, in ApoE^{-/-} mice we observed that VSMCs migrated into the intima of fibrous plaques showed positive staining for IR and IGF-IR. Overall, increased expression of IRA and IGF-IR would be required to support the migration of medial VSMCs into the intima.

Conclusions

In conclusion, our in vitro results strongly suggest that IGF-I is a potent inducer of VSMC migration mainly through IGF-IR, and to a lesser extent through IR. Insulin and IGF-II are less potent and require the presence of IRA isoform to induce migration, by binding IRA homodimers or IRA/IGF-IR hybrid receptors. Therefore, overexpression of IGF-IR or IRA isoform might occur in early stages of atherosclerosis favoring the migration and proliferation of VSMCs and thereby atherosclerotic progression of relevance in experimental mouse models and

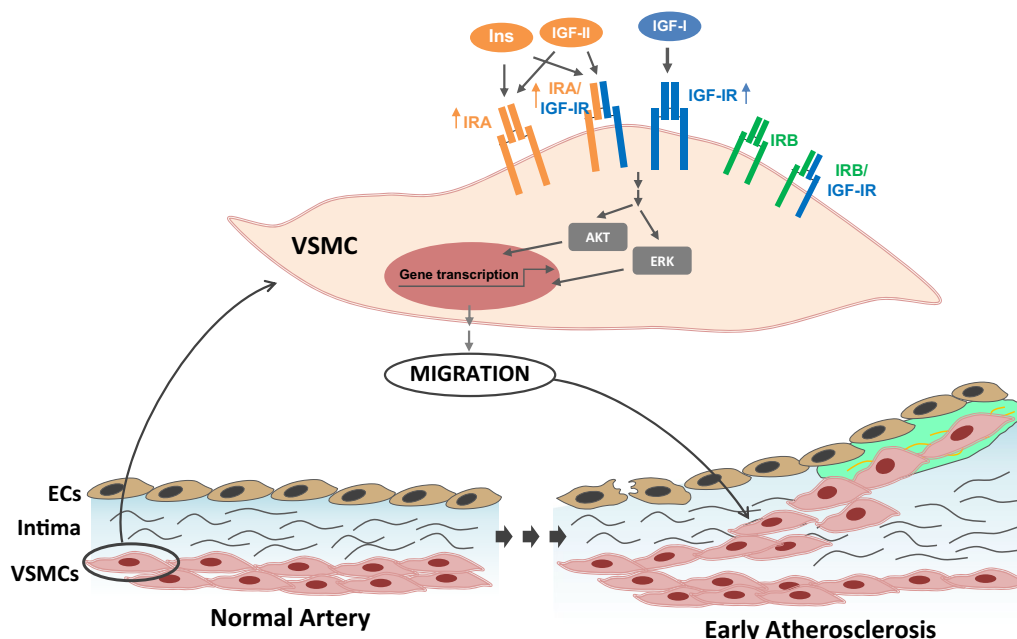


Fig. 7 Proposed model of role of IR isoforms, IGF-IR and IR/IGF-IR hybrid receptors in VSMC migration. We propose that IGF-I mainly through IGF-IR, while insulin and IGF-II by binding IRA homodimers or IRA/IGF-IR hybrid receptors might favor VSMC migration and contribute to plaque growth in early states of atherosclerosis. ECs endothelial cells, VSMCs vascular smooth muscle cells

in humans (Fig. 7). Whether IRA/IGF-IR hybrid receptors play a direct role at the early stage of atherogenesis in humans remains to be established.

Additional files

Additional file 1. Characterization and insulin signaling in VSMC lines. (A) Western blot analysis of IR and IGF-IR in four VSMC lines. * $p < 0.05$ vs IRLoxP^{+/+} VSMCs; † $p < 0.05$, †† $p < 0.005$ vs. IRA VSMCs. Immunoprecipitation of IRβ in IRLoxP^{+/+} or IR^{-/-} (B) Representative gels of Western blot analysis and its quantifications of Akt (T308), p70S6K (T389) and p44/42 MAPK (T202/Y204) phosphorylation in four cell lines stimulated with insulin, IGF-I or IGF-II. Experiments were performed at least 3 times. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ vs each control.

Additional file 2. Measure of MMP-2 and MMP-9 activities by gelatin zymography in IRA and IRB VSMCs stimulated with insulin, IGF-I or IGF-II for 12 or 24h. FBS was used as a positive control.

Additional file 3. Western blot analysis of IR and IGF-IR expression in IRLoxP^{+/+}, IRA and IRB VSMCs stimulated with insulin, IGF-I or IGF-II for 12h.

Additional file 4. Increased expression of IGF-IR and IGFs in media from human aortas bearing fatty streaks. Analysis of mRNA expression of total IR, IRB isoform, IGF-IR and IGFs by qRT-PCR in the medial layer of 28 human aortas (8 healthy, 9 fatty streaks and 11 fibrolipidic lesions). * $p < 0.05$ vs. healthy aorta; † $p < 0.05$ vs. fatty streak.

Abbreviations

α-SMA: α-smooth muscle actin; Akt: protein kinase B; ApoE^{-/-}: apolipoprotein E knockout; BATIRKO: brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout; IGF-IR: insulin-like growth factor-I receptor; IGFs: insulin-like growth factors; IR: insulin receptor; MMPs: matrix metalloproteinases; qRT-PCR: real-time quantitative PCR; VSMCs: vascular smooth muscle cells.

Authors' contributions

NB: has participated in the acquisition of data, analysis and interpretation of data, and writing the manuscript. CE F-G: has participated in the acquisition of data in human samples and helped to draft the manuscript. LP: has participated in the in the experiments of migration VSMCs. OE: has participated in the development of experimental model and helped to draft the manuscript. JB M: has participated in the collection of human samples. G G-G and SF: have participated in the development of experimental model. SD-C: has participated in the acquisition of data. JE: helped to draft the manuscript. AG-H: has participated in the acquisition of data, analysis and interpretation of data and in the design of study and its coordination and in the statistical analysis as well as writing the paper. MB: helped to draft the manuscript and leads as PI the projects that provided financial support for experiments. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Biochemistry and Molecular Biology II Department, School of Pharmacy, Complutense University of Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain. ² Health Research Institute of San Carlos Clinic Hospital (IdISSC), Madrid, Spain. ³ CIBER of Diabetes and Associated Metabolic Diseases (CIBERDEM), Barcelona, Spain. ⁴ Vascular Research Lab, IIS-Fundación Jiménez Díaz-Autónoma University, Madrid, Spain. ⁵ Inserm, U698, Université Paris 7, CHU X-Bichat, Paris, France.

Acknowledgements

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

Ethics approval and consent to participate

Human tissue samples were harvested after organ transplantation with the authorization of the French Biomedicine Agency (authorization number

PFS09-007). Animal studies conform to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, revised 1996) and accord with The ARRIVE Guideline for Reporting Animal research.

Funding

This work was supported by grants SAF2007/60058, SAF2008/00031, SAF2011/22555 and SAF2014-51795-R from Ministerio de Ciencia e Innovación to MB, Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2423) and CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM, ISCIII, Spain) to MB, Spain.

Received: 22 September 2016 Accepted: 22 November 2016

Published online: 01 December 2016

References

- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473:317–25.
- Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118:692–702.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362:801–9.
- Bornfeldt KE, Raines EW, Nakano T, Graves LM, Krebs EG, Ross R. Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *J Clin Invest*. 1994;93:1266–74.
- Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: a review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res*. 2000;86:125–30.
- Ebina Y, Edery M, Ellis L, Standring D, Beaudoin J, Roth RA, Rutter WJ. Expression of a functional human insulin receptor from a cloned cDNA in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:8014–8.
- Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, Jacobs S, Francke U, Ramachandran J, Fujita-Yamaguchi Y. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J*. 1986;5:2503–12.
- Malaguarnera R, Belfiore A. The insulin receptor: a new target for cancer therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2:93.
- Moxham CP, Duronio V, Jacobs S. Insulin-like growth factor I receptor β -subunit heterogeneity. Evidence for hybrid tetramers composed of insulin-like growth factor I and insulin receptor heterodimers. *J Biol Chem*. 1989;264:13238–44.
- Soos MA, Whittaker J, Lammers R, Ullrich A, Siddle K. Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I can form hybrid dimers. Characterisation of hybrid receptors in transfected cells. *Biochem J*. 1990;270:383–90.
- Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev*. 2009;30:586–623.
- Seino S, Bell GI. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;159:312–6.
- Frasca F, Pandini G, Scalia P, Sciacca L, Mineo R, Costantino A, Goldfine ID, Belfiore A, Vigneri R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol*. 1999;19:3278–88.
- Vogt B, Carrascosa JM, Ermel B, Ullrich A, Häring HU. The two isoforms of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;177:1013–8.
- Sciacca L, Prisco M, Wu A, Belfiore A, Vigneri R, Baserga R. Signaling differences from the A and B isoforms of the insulin receptor (IR) in 32D cells in the presence or absence of IR substrate-1. *Endocrinology*. 2003;144:2650–8.
- Escribano O, Gómez-Hernández A, Díaz-Castroverde S, Nevado C, García G, Otero YF, Perdomo L, Beneit N, Benito M. Insulin receptor isoform A confers a higher proliferative capability to pancreatic beta cells enabling glucose availability and IGF-I signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;409:82–91.
- Escribano O, Guillén C, Nevado C, Gómez-Hernández A, Kahn CR, Benito M. Beta-cell hyperplasia induced by hepatic insulin resistance: role of a liver-pancreas endocrine axis through insulin receptor A isoform. *Diabetes*. 2009;58:820–8.
- Díaz-Castroverde S, Gómez-Hernández A, Fernández S, García-Gómez G, Di Scala M, González-Aseguinolaza G, Fernández-Millán E, González-Rodríguez Á, García-Bravo M, Chambon P, Álvarez C, Perdomo L, Beneit N, Escibano O, Benito M. Insulin receptor isoform A ameliorates long term glucose intolerance in diabetic mice. *Dis Model Mech*. 2016;9:1271–81.
- Díaz-Castroverde S, Baos S, Luque M, Di Scala M, González-Aseguinolaza G, Gómez-Hernández A, Beneit N, Escibano O, Benito M. Prevalent role of the insulin receptor isoform A in the regulation of hepatic glycogen metabolism in hepatocytes and in mice. *Diabetologia*. 2016;59:2702–10.
- Sciacca L, Costantino A, Pandini G, Mineo R, Frasca F, Scalia P, Sbraccia P, Goldfine ID, Vigneri R, Belfiore A. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism. *Oncogene*. 1999;18:2471–9.
- Gómez-Hernández A, Escibano O, Perdomo L, Otero YF, García-Gómez G, Fernández S, Beneit N, Benito M. Implication of insulin receptor A isoform and IRA/IGF-IR hybrid receptors in the aortic vascular smooth muscle cell proliferation: role of TNF- α and IGF-II. *Endocrinology*. 2013;154:2352–64.
- Kuzuya M, Kanda S, Sasaki T, Tamaya-Mori N, Cheng XW, Itoh T, Itohara S, Iguchi A. Deficiency of gelatinase A suppresses smooth muscle cell invasion and development of experimental intimal hyperplasia. *Circulation*. 2003;108:1375–81.
- Cho A, Reidy MA. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. *Circ Res*. 2002;91:845–51.
- Johnson C, Galis ZS. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:54–60.
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:133–40.
- Johnson JL. Emerging regulators of vascular smooth muscle cell function in the development and progression of atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2014;103:452–60.
- Siddle K. Signaling by insulin and IGF receptor: supporting acts and new player. *J Mol Endocrinol*. 2011;47:R1–10.
- Bartolomé A, Guillén C, Benito M. Role of the TSC1-TSC2 complex in the integration of insulin and glucose signaling involved in pancreatic beta-cell proliferation. *Endocrinology*. 2010;151:3084–94.
- Sacco A, Morcavallo A, Pandini G, Vigneri R, Belfiore A. Differential signaling activation by insulin and insulin-like growth factors I and II upon binding to insulin receptor isoform A. *Endocrinology*. 2009;150:3594–602.
- Stout RW. Insulin as a mitogenic factor: role in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am J Med*. 1991;90:625–55.
- Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ. Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocr Rev*. 2006;27:242–59.
- Faries PL, Rohan DL, Takahara H, Wyers MC, Contreras MA, Quist WC, King GL, Leger FW. Human vascular smooth muscle cells of diabetic origin exhibit increased proliferation, adhesion, and migration. *J Vasc Surg*. 2001;33:601–7.
- Yang M, Kahn AM. Insulin-inhibited and stimulated cultured vascular smooth muscle cell migration are related to divergent effects on protein phosphatase-2A and autonomous calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Atherosclerosis*. 2008;196:227–33.
- Wang CC, Gurevich I, Draznin B. Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways. *Diabetes*. 2003;52:2562–9.
- Abhijit S, Bhaskaran R, Narayanasamy A, Chakroborty A, Manickam N, Dixit M, Mohan V, Balasubramanyam M. Hyperinsulinemia-induced vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation is mediated by converging mechanisms of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Mol Cell Biochem*. 2013;373:95–105.
- Yu C, Wang Z, Han Y, Liu Y, Wang WE, Chen C, Wang H, Jose PA, Zeng C. Dopamine D₄ receptors inhibit proliferation and migration of vascular smooth muscle cells induced by insulin via down-regulation of insulin receptor expression. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:97.

37. Gockerman A, Prevette T, Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins inhibit the smooth muscle cell migration responses to IGF-I and IGF-II. *Endocrinology*. 1995;136:4168–73.
38. Duan C, Bauchat JR, Hsieh T. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res*. 2000;86:15–23.
39. Girnita A, Girnita L, del Prete F, Bartolazzi A, Larsson O, Axelson M. Cycloignans as inhibitors of the insulin-like growth factor-1 receptor and malignant cell growth. *Cancer Res*. 2004;64:236–42.
40. Vasilcanu D, Girnita A, Girnita L, Vasilcanu R, Axelson M, Larsson O. The cycloignan PPP induces activation loop-specific inhibition of tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor. Link to the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt apoptotic pathway. *Oncogene*. 2004;23:7854–62.
41. Frattali AL, Pessin JE. Relationship between alpha subunit ligand occupancy and beta subunit autophosphorylation in insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors. *J Biol Chem*. 1993;268:7393–400.
42. Chisalita SI, Arnqvist HJ. Expression and function of receptors for insulin-like growth factor-I and insulin in human coronary artery smooth muscle cells. *Diabetologia*. 2005;48:2155–61.
43. Johansson GS, Arnqvist HJ. Insulin and IGF-I action on insulin receptors, IGF-I receptors, and hybrid insulin/IGF-I receptors in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291:E1124–30.
44. Pandini G, Frasca F, Mineo R, Sciacca L, Vigneri R, Belfiore A. Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *J Biol Chem*. 2002;277:39684–95.
45. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation*. 1995;92:1355–74.
46. Polanco JI, Albajar M, Pocoví M, Rodríguez Rey JC. Induction of insulin-like growth factor receptor (IGF IR) mRNA levels by low density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;226:917–22.
47. Jia G, Cheng G, Soundararajan K, Agrawal DK. Insulin-like growth factor-I receptors in atherosclerotic plaques of symptomatic and asymptomatic patients with carotid stenosis: effect of IL-12 and IFN-gamma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H1051–7.
48. von der Thüsen JH, Borensztajn KS, Moimas S, van Heiningen S, Teeling P, van Berkel TJ, Biessen EA. IGF-1 has plaque-stabilizing effects in atherosclerosis by altering vascular smooth muscle cell phenotype. *Am J Pathol*. 2011;178:924–34.
49. Okura Y, Brink M, Zahid AA, Anwar A, Delafontaine P. Decreased expression of insulin-like growth factor-1 and apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaque. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:1777–89.
50. Higashi Y, Sukhanov S, Shai SY, Danchuk S, Tang R, Snarski P, Li Z, Lobelle-Rich P, Wang M, Wang D, Yu H, Korthuis R, Delafontaine P. Insulin-like growth factor 1 receptor deficiency in macrophages accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in Apolipoprotein E deficient mice. *Circulation*. 2016;133:2263–78.
51. Zaina S, Pettersson L, Åhrén B, Brånén L, Hassan AB, Lindholm M, Mattsson R, Thyberg J, Nilsson J. Insulin-like growth factor II plays a central role in atherosclerosis in a mouse model. *J Biol Chem*. 2002;277:4505–11.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



CURRICULUM VITAE

Formación académica

- **Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina.** Universidad Complutense de Madrid, 2013. Nota media del expediente: 8,97
- **Licenciatura en Farmacia.** Universidad Complutense de Madrid, 2012. Nota media del expediente: 7,77

Trayectoria en investigación

- **Octubre-Noviembre 2015:** Estancia científica en el Laboratorio de Patología Vascular, IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM, Madrid.
- **Noviembre 2012-Actualidad:** Miembro del grupo Diabetes y Cardiovascular, Facultad de Farmacia, UCM. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (CIBERDEM).

Publicaciones

- **Beneit N**, Fernández-García CE, Martín-Ventura JL, Perdomo L, Escribano Ó, Michel JB, García-Gómez G, Fernández S, Díaz-Castroverde S, Egido J, Gómez-Hernández A, Benito M. Expression of insulin receptor (IR) A and B isoforms, IGF-IR, and IR/IGF-IR hybrid receptors in vascular smooth muscle cells and their role in cell migration in atherosclerosis. *Cardiovasc Diabetol.* 2016;15(1):161.
- Gómez-Hernández A, **Beneit N**, Díaz-Castroverde S, Escribano Ó. Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications. *Int J Endocrinol.* 2016;2016:1216783. Review.
- Díaz-Castroverde S, Baos S, Luque M, Di Scala M, González-Aseguinolaza G, Gómez-Hernández A, **Beneit N**, Escribano O, Benito M. Prevalent role of the insulin receptor isoform A in the regulation of hepatic glycogen metabolism in hepatocytes and in mice. *Diabetologia.* 2016;59(12):2702-2710.
- Díaz-Castroverde S, Gómez-Hernández A, Fernández S, García-Gómez G, Di Scala M, González-Aseguinolaza G, Fernández-Millán E, González-Rodríguez Á, García-Bravo M, Chambon P, Álvarez C, Perdomo L, **Beneit N**, Escribano O, Benito M. Insulin receptor isoform A ameliorates long-term glucose intolerance in diabetic mice. *Dis Model Mech.* 2016;9(11):1271-1281.
- Gómez-Hernández A, **Beneit N**, Escribano Ó, Díaz-Castroverde S, García-Gómez G, Fernández S, Benito M. Severe Brown Fat Lipoatrophy Aggravates Atherosclerotic Process in Male Mice. *Endocrinology.* 2016;157(9):3517-28.

- Gómez-Hernández A, **Beneit N**, Perdomo L, Escribano O, Sabela Díaz-Castroverde S, Benito M. Role of insulin receptor A isoform and IGF-1R in the development of atherosclerotic plaque. *An Real Acad Farm Vol.* 82, Nº 2 (2016), pp. 129-142.
- Perdomo L, **Beneit N**, Otero YF, Escribano O, Díaz-Castroverde S, Gómez-Hernández A, Benito M. Protector role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. *Cardiovasc Diabetol.* 2015; 14:75.
- Escribano O, Gómez-Hernández A, Díaz-Castroverde S, Nevado C, García G, Otero YF, Perdomo L, **Beneit N**, Benito M. Insulin receptor isoform a confers a higher proliferative capability to pancreatic beta cells enabling glucose availability and IGF-I signalling. *Mol Cell Endocrinol.* 2015; 409:82-91.
- Gómez-Hernández A, Perdomo L, de las Heras N, **Beneit N**, Escribano O, Otero YF, Guillén C, Díaz-Castroverde S, Gozalbo-López B, Cachafeiro V, Lahera V, Benito M. Antagonistic effect of TNF-alpha and insulin on UCP-2 expression and vascular damage. *Cardiovasc Diabetol.* 2014; 13(1):108.
- Gómez-Hernández A, Escribano Ó, Perdomo L, Otero YF, García-Gómez G, Fernández S, **Beneit N**, Benito M. Implication of insulin receptor A isoform and IRA/IGF-IR hybrid receptors in the aortic vascular smooth muscle cell proliferation: role of TNF-α and IGF-II. *Endocrinology.* 2013; 154:2352-64.

Congresos internacionales

- Díaz-Castroverde S, Escribano Ó, Luque M, Gómez-Hernández A, Fernández S, García-Gómez G, González-Asequinolaza G, Di Scala M, **Beneit N**, Perdomo L, Benito M. Gene therapy with insulin receptor isoform A as an approach for the treatment of type 2 diabetes. EASD 51 st annual meeting. Estocolmo, 14-18 Septiembre, 2015.
- Escribano Ó, Díaz-Castroverde S, Gómez-Hernández A, García-Gómez G, Fernández S, Luque M, **Beneit N**, Perdomo L, Benito M. Reversion of type 2 diabetic phenotype by insulin receptor isoform A gene therapy. CNIC Conference "Energy homeostasis and metabolic disease". Madrid, 7-8 Noviembre, 2014.
- Perdomo L, **Beneit N**, Escribano Ó, Gómez-Hernández A, Benito M. Role of IR isoforms and IGF-1R in the migration of vascular smooth muscle cells. XII International Symposium on Insulin Receptors and Insulin Action: New Opportunities for the Prevention and Treatment of Diabetes in the XXI Century. Barcelona, 7-9 Noviembre, 2013.

Congresos nacionales

- **N. Beneit**, A. Gómez-Hernández, P. Majewski, Ó. Escribano, C. Rubio-Longás, A. Raposo, M. Benito. Papel del tejido adiposo marrón en las complicaciones metabólicas asociadas a la obesidad. XXVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Diabetes, Barcelona, 5-7 de Abril, 2017.

- **N. Beneit**, C.E. Fernández-García, J.L. Martín-Ventura, Ó. Escribano, N. de las Heras, JB. Michel, J. Egido, M. Benito, A. Gómez-Hernández. Papel de las isoformas del receptor de la insulina y los receptores de IGFs en el desarrollo del proceso aterosclerótico. 22ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA). Madrid, 29-31 de Marzo, 2017.
- A. Gómez-Hernández, **N. Beneit**, P. Majewski, Ó. Escribano, N. de las Heras, G. García-Gómez, S. Fernández, C. Rubio-Longás, M. Benito. Papel del tejido adiposo marrón en la obesidad y en las complicaciones metabólicas y vasculares asociadas. 22ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA). Madrid, 29-31 de Marzo, 2017.
- **N. Beneit**, Ó. Escribano, S. Díaz-Castroverde, N. de las Heras, G. García-Gómez, S. Fernández, M. Benito, A. Gómez-Hernández. La lipoatrofia marrón severa agrava el proceso aterosclerótico. 21ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA). Valencia, 9-11 de Marzo, 2016.
- S. Díaz-Castroverde, S. Fernández, G. García-Gómez, E. Fernández-Millán, M. Di Scala, G. González-Aseguinolaza, A. Gómez-Hernández, **N. Beneit**, M. Benito, Ó. Escribano. Gene therapy with insulin receptor isoform A as an approach for the treatment of type 2 diabetes. XXXVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. Valencia, 7-10 Septiembre, 2015.
- **N. Beneit**, L. Perdomo, Y.F. Otero, Ó Escribano, S. Díaz-Castroverde, N. de las Heras, M. Benito, A. Gómez-Hernández. Papel protector del ácido oleico en la resistencia cardiovascular a la insulina y en el desarrollo e inestabilidad de la placa aterosclerótica. 20ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA). Oviedo, 11-13 de Marzo, 2015.
- Gómez-Hernández, L. Perdomo, **N. Beneit**, YF. Otero, S. Díaz-Castroverde, Ó. Escribano, M. Benito. Papel Diferencial del Palmitato y Oleato sobre la Resistencia a la Insulina en Células Cardiovasculares. Comunicación Oral. XXV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Diabetes. Pamplona, 3-5 Abril 2014.
- **N. Beneit**, L. Perdomo, Ó. Escribano, S. Díaz-Castroverde, N. de las Heras, M. Benito, A. Gómez-Hernández. Papel de las isoformas del IR e IGF-1R en la migración de las células de músculo liso vascular. 19ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA). Madrid, 26-28 Marzo, 2014.
- Gómez-Hernández, L. Perdomo, N. de las Heras, **N. Beneit**, Ó. Escribano, C. Guillén, S. Díaz-Castroverde, V. Cachafeiro, V. Lahera, M. Benito. Efectos diferenciales del TNF-alpha y la insulina en la modulación de UCP-2 y su papel en el daño vascular. 19ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA). Madrid, 26-28 Marzo, 2014.

- Gómez-Hernández, Ó. Escribano, L. Perdomo, Y.F. Otero, G. García-Gómez, S. Fernández, **N. Beneit**, N. de las Heras, M. Benito. Implicación del IGF-2 y de los receptores híbridos IRA/IGF-1R en la proliferación de las células de músculo liso vascular. 18ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial (SEH-LELHA). Valencia, 6-8 Marzo, 2013.

Premios y becas

- **Premio Juan Abelló del Concurso Científico del Curso 2014 de la Real Academia Nacional de Farmacia.** “Papel de la isoforma A del receptor de la insulina y del IGF-1R en el crecimiento de la placa aterosclerótica”. Presentado por: Almudena Gómez-Hernández, Nuria Beneit, Liliana Perdomo, Óscar Escribano, Sabela Díaz-Castroverde, Manuel Benito.
- **Ayuda para Estancias Cortas en Centros de Referencia de la Fundación SED.** Sociedad Española de Diabetes, 2015.

